

**DER EINFLUSS VON BRADYKININ UND NEUROTENSIN
AUF DIE MOTORIK DER GLATTEN MUSKULATUR
VON DARM UND GEFÄSSEN:
UNTERSUCHUNGEN AM ILEUM DES MEERSCHWEINCHENS,
PFORTADER VON RATTE UND MEERSCHWEINCHEN
UND PIAARTERIEN DER KATZE**

Franz Wagner

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstände: Professor Dr. med. Dr. h.c. K. Thureau

Professor Dr. med. E. Gerlach

Professor Dr. med. G. ten Bruggencate

DER EINFLUSS VON BRADYKININ UND NEUROTENSIN
AUF DIE MOTORIK DER GLATTEN MUSKULATUR
VON DARM UND GEFÄßEN:
UNTERSUCHUNGEN AM ILEUM DES MEERSCHWEINCHENS,
PFORTADER VON RATTE UND MEERSCHWEINCHEN
UND PIAARTERIEN DER KATZE

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Franz Wagner

aus

München

1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. M. Wahl

Prof. Dr. H. Fritz

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Dr. h.c. K. Thureau

Prof. Dr. A. Baethmann

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 07. 1988

1. Einleitung	1
1.1. Peptide als "informationsübertragende Substanzen"	1
1.2. Bradykinin	2
1.2.1. Entdeckung und Struktur von Bradykinin und verwandten Peptiden	2
1.2.2. Vorkommen von Kallikrein und Kininogen, das Kallikrein-Kinin-System	4
1.2.3. Effekte	5
1.2.4. Rezeptoren	7
1.2.5. Abbau von Kininen	8
1.3. Neurotensin	10
1.3.1. Entdeckung und Struktur von Neurotensin und verwandten Peptiden	10
1.3.2. Verteilung des Neurotensins im Organismus	11
1.3.3. Effekte von Neurotensin	12
1.3.4. Rezeptoren	14
1.3.5. Metabolismus von Neurotensin	15
1.4. Ziel der vorliegenden Untersuchung	16
2. Methodik	18
2.1. Präparation der glattmuskulären Organe	18
2.1.1. Präparation des Meerschweinchenileums (MI)	18
2.1.2. Präparation der Meerschweinchenpfortader (MP)	18
2.1.3. Präparation der Meerschweinchenpfortaderlängsstreifen (MP-LS)	18
2.1.4. Präparation der Rattenpfortader (RP)	19
2.1.5. Präparation der Rattenpfortaderlängsstreifen (RP-LS)	19
2.1.6. Fixierung der Präparate im Organbad und Messung der isometrischen Kontraktion	19
2.2. Herstellung und Aufbewahrung der Verdünnungen der Testsubstanzen	20
2.3. Durchführung der Messungen	21
2.3.1. Prinzipieller Ablauf der Versuche	21
2.3.2. Die einzelnen Versuchsprotokolle	21
2.3.2.1. Versuche zur Prüfung der Haltbarkeit von Bradykinin am Meerschweinchenileum	22
2.3.2.2. Vergleich verschiedener Bradykininchargen am Meerschweinchenileum	22
2.3.2.3. Versuche zur Wirkung von Kininase II Inhibitoren auf den Bradykinineffekt am Meerschweinchenileum	22

-II-

2.3.2.4. Versuche zur Wirkung von Neurotensin (NT) am Meer- schweinchenileum	23
2.3.2.5. Versuche zur Wirkung von Neurotensin an der Meer- schweinchenpfortader	23
2.3.2.6. Versuche zur Wirkung von Neurotensin an Rattenpfort- ader und Längsstreifen der Pfortadern von Ratte und Meerschweinchen	23
2.4. Auswertung der Messungen	23
2.5. In-situ-Versuche an Hirnarterien der Katze	25
2.6. Zusammensetzung der Lösungen	27
2.7. Benutzte Substanzen	27
2.8. Statistische Auswertung	27
3. Ergebnisse	29
3.1. In-vitro-Versuche	29
3.1.1. Ergebnisse am terminalen Meerschweinchenileum	29
3.1.1.1. Die Spontanmotorik des Darms	29
3.1.1.2. Der Lösungsmittleffekt	29
3.1.1.3. Der Effekt von Bradykinin (BK) am Meerschweinchenileum	30
3.1.1.3.1. Prüfung der Haltbarkeit von Bradykininlösungen	31
3.1.1.3.2. Vergleich verschiedener Bradykinin-Chargen	35
3.1.1.4. Die Veränderung der Bradykinin-Dosis-Wirkungs-Kurve durch Hemmstoffe der Kininase II	37
3.1.1.5. Der Effekt von Neurotensin am Meerschweinchenileum	45
3.1.1.6. Effekte von Noradrenalin und Carbachol am Meerschwein- chenileum	48
3.1.2. Die Ergebnisse an den Pfortaderpräparationen	49
3.1.2.1. Die Spontanmotorik der Vena portae	49
3.1.2.2. Der Lösungsmittleffekt an der Vena portae	50
3.1.2.3. Der Effekt von Neurotensin auf die Meerschweinchen- pfortader	51
3.1.2.4. Der Effekt von Neurotensin am Längsstreifen der Rattenpfortader	55
3.1.2.5. Der Effekt von Carbachol, Noradrenalin und Bradykinin an der Pfortader	56
3.2. Ergebnisse an den Piaarteriolen in situ	58
3.2.1. Der Lösungsmittleffekt an den Piaarteriolen	58
3.2.2. Der Effekt von Bradykinin	58
3.2.3. Der Effekt von Hemmstoffen der Kininase II	60

3.2.4. Der Einfluß von Hemmstoffen der Kininase II auf die Bradykinin-Dosis-Wirkungs-Kurve	61
3.2.5. Der Effekt von Neurotensin	62
4. Diskussion	64
4.1. Diskussion der Methodik	64
4.1.1. Diskussion der Methodik in vitro	64
4.1.1.1. Grundvoraussetzungen für eine Messung	64
4.1.1.2. Mögliche Fehlerquellen	69
4.1.1.2.1. Fehler in der Substanzkonzentration	69
4.1.1.2.2. Fehler in der gemessenen Kraft	71
4.1.1.2.3. Lösungsmittelleffekt	72
4.1.1.3. Zur Auswertemethode	72
4.1.1.3.1. Die Zunahme der Basalkraft als sinnvoller Parameter	72
4.1.1.3.2. Statistische Auswertung	73
4.1.1.4. Vergleichbarkeit von mit in-vitro-Methoden erhobenen Daten	76
4.1.1.5. Grenzen der Technik, Vorteile der in-vivo-Präparation	81
4.1.2. Zur Methodik in situ	81
4.2. Diskussion der Ergebnisse	82
4.2.1. Untersuchungen am Darm	82
4.2.1.1. Der Effekt von Bradykinin am Meerschweinchenileum	82
4.2.1.1.1. Vergleich mit Literaturangaben	82
4.2.1.1.2. Zum Mechanismus des Bradykinineffekts am Meerschweinchenileum	86
4.2.1.1.3. Vergleich verschiedener Bradykininlösungen	87
4.2.1.1.3.1. Hinweise auf die Instabilität von Bradykinin in der Literatur	87
4.2.1.1.3.2. Stabilität des Bradykinins im Laufe eines Versuchstages	88
4.2.1.1.3.3. Vergleich verschiedener Chargen	89
4.2.1.1.4. Die Wirkung von Hemmstoffen der Kininase II am Meerschweinchenileum	89
4.2.1.1.4.1. Der bradykininpotenzierende Effekt verschiedener Substanzen am Meerschweinchenileum	89
4.2.1.1.4.2. Der Einfluß der Kininase II-Hemmer auf den Bradykinineffekt am Meerschweinchenileum	91
4.2.1.1.4.3. Der Mechanismus der Bradykinin-Potenzierung	92
4.2.1.1.5. Bedeutung der Kinine am Darm	93
4.2.1.2. Der Effekt von Neurotensin am Darm	93

4.2.1.2.1. Vergleich mit Literaturangaben	93
4.2.1.2.2. Der Mechanismus des Neurotensineffekts	97
4.2.1.2.3. Die Bedeutung des Neurotensins am Darm	98
4.2.1.3. Vergleich des Effektes von Neurotensin mit dem von Noradrenalin und Carbachol	99
4.2.2. Diskussion der Ergebnisse an der Pfortader	100
4.2.2.1. Der Effekt von Neurotensin an der Rattenpfortader	100
4.2.2.2. Fehlen eines Neurotensineffekts an der Meerschwein- chenpfortader	100
4.2.2.3. Die Bedeutung von Neurotensin an der Pfortader	102
4.2.3. Diskussion der Ergebnisse an den Hirngefäßen	103
4.2.3.1. Der Effekt von Bradykinin an Hirngefäßen	103
4.2.3.1.1. Kinineffekt an Hirngefäßen	103
4.2.3.1.2. Vergleich des Bradykinineffekts mit den anderen Substanzen	105
4.2.3.1.3. Wirkungsmechanismus von Bradykinin	106
4.2.3.2. Bedeutung der Kininase II für den Kinin-Abbau im Gehirn	107
4.2.3.2.1. Effekt von Hemmstoffen der Kininase II	107
4.2.3.2.2. Vergleich mit anderen Ergebnissen	108
4.2.3.2.3. Mögliche Funktionen der Kininase II	109
4.2.3.3. Die Bedeutung der Kinine für die zerebrale Zirkulation	110
4.2.3.3.1. Bedeutung der Kinine unter physiologischen Bedingun- gen	110
4.2.3.3.2. Bedeutung der Kinine unter pathophysiologischen Bedingungen	111
4.2.3.4. Der Effekt von Neurotensin an Hirngefäßen	112
4.2.3.4.1. Fehlen eines vasomotorischen Neurotensin-Effekts an Hirngefäßen der Katze	112
4.2.3.4.2. Mögliche Bedeutung der Neurotensin-immunoreaktiven Innervation	113
4.2.3.5. Die Bedeutung von Peptiden für die Regulation des Hirnkreislaufs	114
4.3. Abschließende Bemerkungen	115
4.3.1. Analogien von Bradykinin und Neurotensin	115
4.3.2. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen	116
5. Zusammenfassung	117
Literatur	120

1. Einleitung

1.1. Peptide als "informationsübertragende Substanzen"

Eine Voraussetzung für einen sinnvoll agierenden mehrzelligen Organismus ist der effektive Informationsaustausch zwischen verschiedenen Zellen. Am Beispiel der glatten Muskulatur sei kurz dargestellt, wie dazu verschiedene Mechanismen zusammenwirken:

Die einzelnen Zellen sind elektrisch erregbar, z.T. sind sie elektrisch miteinander gekoppelt (z.B. circuläre Muskulatur des Gastrointestinaltrakts 22). Lokal wirksam werdende metabolische Einflüsse (z.B. pH der Umgebung 169) und lokal wirksam werdende humorale Faktoren (z.B. Histamin 296) sorgen dafür, daß sich die Einzelzelle den örtlichen Erfordernissen anpaßt. Die Einbindung des Organs in den Organismus wird durch die übergeordneten Regelmechanismen des Nervensystems und des Endokriniums (245) vermittelt. Dabei dienen spezifische chemische Substanzen, beim Nervensystem im Bereich des synaptischen Spalts freigesetzte Neurotransmitter und beim Endokrinium im Gesamtorganismus wirkende Hormone der Übermittlung der Information auf die betroffenen Zellen.

Neben anderen, chemisch recht verschiedenartigen Substanzen (z.B. Prostaglandine, Leukotriene, Steroidhormone, Terpene, Aminosäureabkömmlinge, Nukleotide) dienen dabei zahlreiche Peptide, Proteine und Glykoproteide der Kommunikation.

Manchmal erfüllt ein und das selbe Peptid verschiedene Funktionen in verschiedenen Organsystemen und kann beispielsweise gleichzeitig Neurotransmitter und Hormon sein (112, 175). Dies wird verständlich, wenn man beachtet, daß zahlreiche der Kommunikation dienende Peptide phylogenetisch sehr alte Substanzen sind und auf einem Organisationsniveau entstanden, auf dem es noch keine Unterscheidung von Endokrinium, Nerven- und Immunsystem gab (112, 175, 202, 244).

Verbesserte biochemische und immunologische Methoden erleichterten in letzter Zeit Strukturaufklärung, Synthese und Lokalisation der Peptide, so daß es zu einer starken Zunahme der Kenntnisse über natürlich vorkommende Peptide als "informationsübermittelnde Substanzen" kam, wobei sowohl neue Peptide entdeckt, als auch neue Aspekte zu länger bekannten Substanzen gewonnen wurden. Nach wie vor jedoch stützt sich der Wissenszuwachs über die physiologische Funktion dieser Substanzen auf zahlreiche Einzeluntersuchungen, die die Wirkung einzelner Peptide in eng umschriebenen experimentellen Modellen beschreiben. So beschäftigt sich die vorliegende Untersuchung mit der Wirkung von Bradykinin und Neurotensin, zwei Oligopeptiden, an der glatten Muskulatur von Darm und Gefäßen, wobei als experimentelle Modelle Meerschweinchenileum, Pfortader von der Ratte und Meerschweinchen in isometrischer Meßanordnung in vitro und Piaarteriolen der Katze in situ dienen.

1.2. Bradykinin

1.2.1. Entdeckung und Struktur von Bradykinin und verwandten Peptiden

Bradykinin ist ein Nonapeptid, dessen Sequenz (Abb. 1.1) 1960 von Boissonas aufgeklärt wurde (zit. nach 82). Die Erforschung des Kininsystems geht jedoch wesentlich weiter zurück (196, 314): Schon 1909 beschrieben Abelous und Bardier (2), daß es bei Hunden nach i.v. Gabe von Urin zu Blutdruckabfall kam. 1928 charakterisierten Frey und Kraut (93) in München die hypotensive Substanz weiter und nannten sie zunächst "Kreislaufhormon", später, nachdem sie sie auch im Pankreas nachgewiesen hatten, "Kallikrein". Werle (315) entdeckte 1937, daß Kallikrein selbst am Meerschweinchenileum nahezu inaktiv ist, jedoch nach Inkubation mit Blut zu Kontraktionen führte; die freigesetzte Substanz nannte er "darmkontrahierenden Stoff", später "Kallidin". 1949 isolierte Rocha e Silva (241) aus mit Gift von Bothrops jararaca behandeltem Blut eine Substanz, die zu "langsamen" Kontraktionen des Meerschweinchenileums führte und deshalb von ihm "Bradykinin" genannt wurde.

Bradykinin	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
Kallidin	Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
Met-Lys-Bradykinin	Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
Ala ³ -Lys-Bradykinin	Lys-Arg-Pro-Ala-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
T-Kinin	<u>Ile-Ser</u> -Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
Des-Arg ⁹ -Bradykinin	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe

Abbildung 1.1

Aminosäuresequenzen der wesentlichen bei Säugetieren auftretenden Kinine. Ala³-Lys-Bradykinin wurde bisher nur beim Menschen, T-Kinin nur bei der Ratte nachgewiesen. Nicht in der Sequenz von Met-Lys-Bradykinin enthaltene Aminosäuren sind durch Unterstreichung hervorgehoben.

Im heutigen Sprachgebrauch werden Kinine produzierende Enzyme teilweise als Kallikreine bezeichnet oder unter dem Begriff Kininogenasen zusammengefaßt. Unter den Kininen sind die biologisch wichtigsten das Kallidin und Bradykinin, deren Sequenzen in Abb. 1.1 angegeben sind. Davon abzugrenzen sind "Tachykinine" (z.B. Substanz P) und die Leukokinine (107), die nur entfernte Ähnlichkeit besitzen.

Neben Kallidin und Bradykinin treten bei Säugetieren unter bestimmten Bedingungen noch weitere Kinine auf, die sich in ihrer biologischen Aktivität nur wenig von Bradykinin unterscheiden (73). Die erst relativ kurz zurückliegende Entdeckung von T-Kinin (204) und (Ala³)-Lys-Bradykinin (192) zeigt, daß sich mit neuen Methoden auch auf zunächst weitgehend erforscht erscheinenden Bereichen neue Ergebnisse gewinnen lassen (108). Der Nachweis biologisch kinin-ähnlicher, aber nicht identischer Substanzen aus Magengewebe (159) könnte darauf hindeuten, daß noch mehr bisher nicht identifizierte Kinine bei Säugetieren existieren.

Bei Nichtsäugetieren sind zahlreiche, dem Bradykinin in der Sequenz mehr oder weniger ähnliche Substanzen entdeckt worden, eine Reihe davon in Giftstoffen, z.B. Wespengift (216).



1.2.2. Vorkommen von Kallikrein und Kininogen, das Kallikrein-Kinin-System

Kinine entstehen durch die Wirkung von als Kallikreine bzw. Kininogenasen bezeichneten Enzymen als proteolytische Abspaltung von Proteinen, die entsprechend Kininogene genannt werden (196). Kinine werden im Blut schnell durch Kininasen abgebaut (227), und es ist unwahrscheinlich, daß in einem Organ entstandene Kinine unter physiologischen Bedingungen ein anderes Organ wesentlich beeinflussen können. Unter pathologischen Bedingungen können jedoch auch im zirkulierenden Blut beträchtliche Konzentrationen von Kininen auftreten (61).

Plasma enthält Präkallikrein, Kininogene und Kininasen (195, 196, 227), das heißt, es existiert im Blut ein komplettes Kininsystem mit auf- und abbauenden Enzymen, das man auch als intravasales Kallikrein-Kinin-System bezeichnen kann. Plasmakallikrein wird in der Leber produziert und durch Faktor XII aktiviert (196). Im Plasma existieren mindestens drei Kininogen-Typen (13), wobei HMW-(High Molecular Weight)-Kininogen und LMW-(Low Molecular Weight)-Kininogen beim Menschen die Sequenz von Met-Lys-Bradykinin enthalten (204). Sie werden beide vom selben Gen codiert und entstehen durch unterschiedliches Processing der RNA (157). Neben der Kininproduktion dienen sie auch als Hemmstoffe von Alpha-Cystein-Proteinasen (197). Plasmakallikrein spaltet bevorzugt HMW-Kininogen (195), LMW-Kininogen spielt möglicherweise eine Rolle als Substrat für Gewebeskallikreine (227). Das dritte Kininogen im Plasma, T-Kininogen, enthält die Sequenz von T-Kinin (108) und tritt bei der Ratte bei Entzündungsreaktionen in stark vermehrtem Umfang auf ("akute-Phase-Protein", 13).

Neben dem intravasalen Kallikrein-Kinin-System existieren auch extravasale oder Gewebs-Kallikrein-Kinin-Systeme, die den lokalen Auf- und Abbau von Kininen ermöglichen. Gewebs-Kallikreine unterscheiden sich vom Plasmakallikrein (227, 252) und wurden in Niere (im distalen Tubulus), Pankreas, Speicheldrüsen und Geschlechtsdrüsen nachgewiesen (252). Gewebs-Kallikreine

setzen v.a. Kallidin frei (252).

Im Gehirn gibt es Kininogenase-Aktivität (51,130,144,257), das im Gehirn gefundene Kallikrein ähnelt weitgehend dem der Niere (51). Auch Kinine und Kininaktivität findet man im Gehirn (64,130,213, 214,257,260), Kininartige Immunoreaktivität ist z.T. neural lokalisiert (64). Chromatographisch und immunologisch entspricht die Kininaktivität im Rattenhirn weitgehend Bradykinin (214).

1.2.3. Effekte

Entsprechend ihrer weiten Verbreitung wurden für Kinine eine Vielzahl von Effekten beschrieben, deren physiologische Relevanz allerdings zum Teil unklar ist. Im folgenden sind beispielhaft Effekte von Bradykinin in einigen Organen und Systemen aufgeführt.

Kinine spielen wahrscheinlich eine Rolle bei der Genese des entzündlichen Ödems (181, 203). Sie führen häufig zu Venokonstriktion, Arterioldilatation, erhöhter Rekrutierung von Kapillaren (137) und Permeabilitätserhöhung der Gefäße (137, 226, 227), die sich vor allem im Bereich der Venolen abspielt (111, 267, 268). Neben einer direkten vaskulären Wirkung setzen Kinine weitere Entzündungsmediatoren wie Histamin (134, 138) und Prostaglandine (199) frei.

Außerdem lösen Kinine verschiedene kardiovaskuläre Effekte aus. Intravenöse Gabe von Kininen führt zu Blutdruckabfall (227), in einigen Fällen (171, 177) wird auch eine biphasisch hypo-hypertensive Antwort ausgelöst. Dies ist offensichtlich dadurch bedingt, daß neben dem direkten vaskulären Effekten von Bradykinin sekundäre Mediatoren wie Prostaglandine und Katecholamine freigesetzt werden und auch Kreislaufreflexe ausgelöst werden (137). Als indirekte Reaktion auf die Schmerzwirkung kann es zum Anstieg von Herzfrequenz und Blutdruck kommen (227).

Am Herz selbst lösen Kinine eine Prostaglandin-vermittelte

Dilatation der Koronararterien aus und hemmen den metabolischen Catecholamineffekt (137). An der Gefäßmuskulatur führen Kinine in vitro in Abhängigkeit von Spezies und Gefäßbett zu Kontraktion oder Relaxation (137, 226, 227), Venen werden im allgemeinen konstringiert. Das Verhalten von Arterien spiegelt zum Teil den Rezeptortyp (226) wieder: B_2 -Rezeptoren führen zur Relaxation, wozu häufig intaktes Endothel notwendig ist (50, 55), B_1 -Rezeptoren meist zur Konstriktion. Da B_1 -Rezeptoren bei Inkubation in vitro zunehmen (227), kann sich das Verhalten eines Präparates im Verlauf der Inkubation ändern (z.B. A. basilaris des Kaninchens, 316).

Die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltrakts zeigt in vitro in Abhängigkeit von Spezies, Lokalisation im Gastrointestinaltrakt und experimentellen Bedingungen unterschiedliche Reaktionen auf Kinine (16, 137, 303). In den meisten Fällen, u.a. Ileum und Colon des Meerschweinchens, unterer Ösophagusphinkter der Ratte, Rattenmagen, Katzenjejunum, Duodenum, Ileum und Colon des Kaninchens, Duodenum und Colon des Hundes wird die Darmmuskulatur kontrahiert; das Duodenum und Colon der Ratte, unterer Ösophagusphinkter des Meerschweinchens und Affenileum jedoch relaxiert. Vorkontrahierte Präparate von Ileum und Taenia coli des Meerschweinchens und Kaninchenileum zeigen eine biphasische Antwort, bei der auf eine Relaxation eine Kontraktion folgt. Die Bedeutung der Kinine im Gastrointestinaltrakt in vivo ist noch nicht sicher einzuordnen (16). Neben der motorischen Wirkung fördern Kinine die Durchblutung und beeinflussen Elektrolyt- und Nahrungsabsorption (137). Sie haben trophische Effekte u.a. an der Darmmukosa (106, 137).

In der Niere sind alle Komponenten eines Kallikrein-Kinin-Systems vorhanden (46, 196). Wegen der ausgeprägten Kininase-Aktivität ist es unwahrscheinlich, daß Kinine aus dem Blut die Niere wesentlich beeinflussen. Das Nieren-Kallikrein-Kinin-System wirkt zusammen mit Prostaglandinen bei der Regulation der Wasser- und Elektrolyt-Sekretion und Absorption mit (46, 196, 255, 310). Bradykinin wirkt dabei u.a. diuretisch und natriuretisch (310), es hemmt cAMP-vermittelte ADH-Effekte durch

Prostaglandinsynthese (255), die Daten sind jedoch etwas widersprüchlich und die Effekte variieren in Abhängigkeit von der Spezies.

Im Zentralnervensystem löst intracerebroventrikuläre Applikation von Kininen eine Reihe von Verhaltensänderungen meist dämpfender Natur, Blutdrucksteigerung und Hyperthermie aus (57). Im EEG sieht man Zeichen der Aktivierung (142, 282).

Ein erheblicher Teil der Effekte wird nicht direkt durch die Kinine ausgelöst, sondern durch andere Mediatoren vermittelt (199, 272). So führen Kinine zur Histaminfreisetzung aus Mastzellen (134, 138) und stimulieren die Bildung von Prostaglandinen (199) und Leukotrienen (50), die wiederum häufig mit Kininen synergistisch wirken (188, 199). Einige Effekte an Gefäßen werden möglicherweise durch freie Radikale vermittelt (161). Die Relaxation der Arterien ist in einigen Präparationen abhängig vom intakten Endothel, das einen "Endothelium-derived relaxing factor" (55) produziert.

1.2.4. Rezeptoren

Aufgrund der unterschiedlichen Wirkung von Agonisten und Antagonisten werden zwei Kininrezeptoren, B_1 - und B_2 -kininerge Rezeptoren, postuliert. Regoli et al. (228) konnten zeigen, daß sich die Kaninchenaorta in vitro in einigen pharmakologischen Eigenschaften von anderen untersuchten Präparationen (Katzenileum, V. jugularis des Kaninchens, Hundecarotis) unterschied. So ist die Reihenfolge der Potenz verschiedener Agonisten an der Kaninchenaorta

des-Arg¹⁰-Kallidin > des-Arg⁹-BK > Kallidin > BK > Tyr(Me)⁸-BK,

an den anderen Präparationen jedoch

Tyr(Me)⁸-BK > BK > Kallidin > des-Arg¹⁰-Kallidin des-Arg⁹-BK,

und Des-Arg⁹, Leu⁸-BK wirkt an der Kaninchenaorta, nicht jedoch an den übrigen Präparationen als kompetitiver Antagonist. Der Rezeptor an der Kaninchenaorta wird B_1 -Rezeptor genannt, der an den übrigen Präparationen B_2 -Rezeptor. B_1 -Rezeptoren treten außer an der Kaninchenaorta auch an weiteren

Präparationen auf, interessanterweise nimmt ihre Aktivität meist während wiederholter Exposition mit Bradykinin in vitro zu (227). Dieser Effekt läßt sich durch Hemmstoffe der Proteinsynthese verhindern, so daß es anscheinend zur Neusynthese von B_1 -Rezeptoren kommt. In vivo werden B_1 -Rezeptoren an einigen Präparationen durch entzündliche Reize stimuliert (227). Neben dem oben erwähnten B_1 -Antagonisten sind inzwischen auch B_2 -Antagonisten synthetisiert worden (Abb. 1.2, 225, 289), die schnell zu B_1 -Antagonisten metabolisiert werden und deshalb sowohl B_2 - als auch B_1 -Effekte antagonisieren (229). Sie konnten jedoch zum Zeitpunkt der in dieser Arbeit aufgeführten Untersuchungen mit Bradykinin noch nicht eingesetzt werden.

	Agonist	Antagonist
B_1 -Rezeptor	des-Arg ⁹ -Bradykinin	des-Arg ⁹ -Leu ⁸ -Bradykinin
B_2 -Rezeptor	Bradykinin	Thi ^{5,8} ,D-Phe ⁷ -Bradykinin

Abbildung 1.2

B_1 - und B_2 -Rezeptor-Agonisten und Antagonisten

Es ist jeweils ein typischer Vertreter angegeben. Die B_2 -spezifischen Substanzen werden in vivo lokal zu B_1 -spezifischen metabolisiert und daher sowohl B_2 - als auch B_1 -Rezeptoren beeinflußt.

1.2.5. Abbau von Kininen

Kinine werden durch eine Reihe von Enzymen variabler Spezifität abgebaut (Abb. 1.3), die sich außerdem in Molekulargewicht, pH-Optimum, und Beeinflussung durch Hemmstoffe und Aktivatoren unterscheiden.

Kininase I, auch Carboxypeptidase N genannt, spaltet von Bradykinin und Kallidin das carboxyterminale Arginin ab (84, 85) und inaktiviert sie damit für B_2 -Rezeptoren. Kininase I ist für etwa 90 % des Kininabbaus im Plasma verantwortlich (227) und spaltet neben Kininen auch Anaphylatoxin C3a (85). Da das durch Kininase I entstehende des-Arg⁹-Bradykinin ein potenterer B_1 -Agonist als das Ausgangsprodukt ist, könnte eine

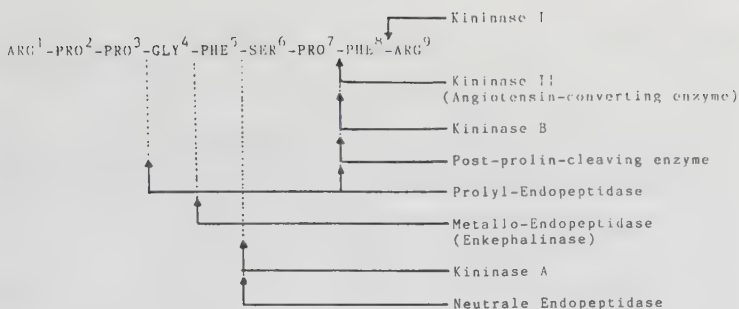


Abbildung 1.3

Bradykinin spaltende Enzyme. Es ist jeweils die Spaltstelle mit Pfeil angezeigt

Funktion von Kininase I auch unter pathophysiologischen Bedingungen darin bestehen, daß die Wirkung von Bradykinin auf B₁-Rezeptoren über die Umwandlung in des-Arg⁹-Bradykinin zu fördern (181).

Kininase II (Peptidyldipeptidase) ist ein meist membrangebundenes Glykoprotein (69, 85), das für etwa 10 % des Kininabbaus im Plasma (227), aber für den größten Teil des Kininabbaus während einer Lungenpassage verantwortlich ist (85, 227). Kininase II läßt sich im Gefäßendothel besonders der Lungen, in Niere, Hoden, Hypophyse, Plexus chorioides und Meerschweinchenileummucosa nachweisen (84, 85). Im Gehirn ist es in einigen Kerngebieten, z.B. Caudatum besonders konzentriert (8,9, 65, 217) und z.T. in Nervenendigungen (212), z.T. im Bereich der Gefäße (23, 100) lokalisiert. Es spaltet die beiden C-terminalen Aminosäuren von Bradykinin ab und inaktiviert es damit vollständig. Weitere Peptide, die von Kininase II inaktiviert werden, sind u.a. das Fibrinopeptid FDP-6a (181), Neurotensin (262), Enkephaline (262), Substanz P (275, 329), Substanz K (275), wobei die letzten beiden nur vom Enzym aus dem Gehirn hydrolysiert werden (275, 329). Daneben aktiviert es Angiotensin I zu Angiotensin II und wird deshalb auch als Angiotensin-converting enzyme bezeichnet (11, 85, 201).

Es sind eine Reihe von Hemmstoffen von Kininase II bekannt. Man

kann sie in Peptide, Peptidanaloga und Bakterienprodukte einteilen (59, 206). Kininase II-hemmende Peptide wurden zunächst in Schlangengift entdeckt (z.B. Bradykinin Potentiator C), später auch synthetisiert (206, 264). Die Wirkung ist bei einem Teil nicht völlig spezifisch für Kininase II (264), es werden z.T. auch andere Peptidasen wie Kininase B (182) und "Thyroliberin-deamidating enzyme" (158) gehemmt. Peptidanaloga wie Captopril wurden gezielt nach einem hypothetischen Modell des aktiven Zentrums der Kininase II entwickelt (207), neben der Hemmung von Kininase II haben sie nur wenige unspezifische Wirkungen (110, 136). Bakterienprodukte sind derzeit nur von theoretischem Interesse als Ausgangspunkt für neue Hemmstoffe (59).

Neben Kininase I und Kininase II gibt es noch eine Reihe weiterer mehr oder weniger gut charakterisierter kininspalten-der Peptidasen. Eine Reihe davon wurde im Gehirn nachgewiesen (143), hier sind Kininase A (33, 34, 205), Kininase B (33, 34, 205), neutrale Endopeptidase (Enkephalinase, 6, 98), Kationensensitive Endopeptidase (158, 324), Postproline cleaving Enzyme (309, 330, 331), Brain proline Endopeptidase (158, 208, 248, 270, 323) zu nennen. Die Angriffspunkte der Kininasen sind in Abb. 1.3 zusammengestellt.

1.3. Neurotensin

1.3.1. Entdeckung und Struktur von Neurotensin und verwandten Peptiden

Neurotensin ist ein Tridekapeptid, das 1973 von Carraway und Leeman entdeckt und aus Rinderhypothalami isoliert wurde (41). 1975 (42,43, 273) gelang die Aufklärung der Aminosäuresequenz, die in Abbildung 1.4 gezeigt ist, und die Synthese. Später wurde Neurotensin auch im Darm des Rindes (40, 151) und bei anderen Säugetieren wie auch beim Menschen (116) nachgewiesen. Meerschweinchenneurotensin weicht in einer Aminosäure vom Rinderneurotensin ab (Abb. 1.4, 259). Auch bei anderen Wirbeltieren fand man eng verwandte Substanzen, so unterscheidet sich

Hühner-Neurotensin (Abb. 1.4) nur in drei Aminosäuren vom Rinderneurotensin (36).

Neurotensin (Rind, Mensch)	pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu
Neurotensin (Meerschwein.)	pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Ser-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu
Hühner-Neurotensin	pGlu-Leu- <u>His-Val</u> -Asn-Lys- <u>Ala</u> -Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu

Neuromedin N	<u>Lys-Ile-Pro-Tyr-Ile-Leu</u>
LANT-6	<u>Lys-Asn-Pro-Tyr-Ile-Leu</u>

Xenopsin	<u>pGly-Gly-Lys-Arg-Pro-Trp-Ile-Leu</u>
----------	---

Abbildung 1.4
Aminosäuresequenz von Neurotensin und verwandten Peptiden

Zusätzlich zu Neurotensin existieren bei zahlreichen Spezies kürzere, strukturähnliche Peptide (Abb. 1.4) wie Xenopsin beim glatten Krallenfrosch *Xenopus laevis* (7, 104), Leucin-Alanin-Neurotensin-6 (feste Abkürzung LANT-6) bei Hühnern (38) und Neuromedin N bei Schweinen (191). Die physiologische Bedeutung dieser Substanzen ist noch weitgehend unklar, in vitro wirken sie wie schwache Neurotensin-Agonisten (152, 191), wobei die Aktivität je nach Lokalisation der Zielzellen variiert (139). Vermutlich treten noch weitere strukturähnliche Peptide unter gewissen Bedingungen auf, so wurde die Freisetzung von Neurotensin- und Xenopsin-immunoreaktiven Substanzen, die chromatographisch nicht mit den bisher bekannten identisch waren, bei saurer Extraktion von Magengewebe beschrieben (35, 39). Mit Antikörpern gegen das COOH-terminale Ende von Neurotensin reagierende Substanzen wurden bei zahlreichen Invertebraten einschließlich Coelenteraten (45) und Bakterien (18) gefunden.

1.3.2. Verteilung des Neurotensins im Organismus

Im Organismus kommt Neurotensin nahezu ausschließlich im zentralen und peripheren Nervensystem und im Gastrointestinaltrakt vor. Bei der 3 Wochen alten Ratte findet man etwa 10 % der Neurotensinaktivität im Gehirn, und 85 % im Darm (44).

Im Gehirn ist das Neurotensin in Nervenzellen und deren Fort-

sätzen lokalisiert (24, 231, 263). Es wurden Neurotensin-reiche Kerne und Bahnen beschrieben (218, 231, 263). Neurotensin-immunoreaktive Nervenfasern begleiten nahezu sämtliche Gefäße (231), auch Hirngefäße (49), daneben sind sie in Herz, Gastrointestinaltrakt und Niere nachweisbar (231). Die Perikarya dieser Nervenfasern liegen wahrscheinlich im Zentralnervensystem, z.B. der Substantia gelatinosa des Rückenmarks (232). Damit übereinstimmend sind in keiner der Studien, in denen Neurotensin-immunoreaktive Nervenfasern beschrieben wurden (176, 231, 233, 254) Neurotensin-haltige, peripher gelegene Perikarya gefunden worden.

Die Hauptmenge des Darmneurotensins befindet sich in der Mukosa (129), in sogenannten N-Zellen (25, 231, 263) und ist im Ileum besonders konzentriert (25, 129). Diese Zellen erfüllen möglicherweise endokrine Funktionen; Neurotensin ist in Konzentrationen im Blut nachweisbar, die unter experimentellen Bedingungen zu deutlichen Effekten führen (89). Dabei sind Lipide im Dünndarm ein wesentlicher Reiz für die Neurotensinsekretion (88, 274).

1.3.3. Effekte von Neurotensin

Im Zentralnervensystem scheint Neurotensin als Neurotransmitter zu wirken. Dafür spricht, daß es in der Synaptosomenfraktion vorhanden ist, nach Depolarisation freigesetzt wird, von Neuronen spezifisch gebunden wird (250), zur langsamen Depolarisation oder Hemmung spontaner Depolarisationen führt und rasch abgebaut wird (24, 231, 263).

Bei intracerebroventriculärer Gabe besitzt Neurotensin eine Vielzahl von Effekten (200, 218, 231, 263), deren physiologische Bedeutung z.T. nicht völlig klar ist. Beispielhaft lassen sich folgende Wirkungen aufführen: Hypothermie, Antinozizeption, Katalepsie, Potenzierung der durch Barbiturate und Äthanol hervorgerufenen Sedation, Muskelrelaxation, Änderung der lokomotorischen Aktivität, cytoprotektiver Effekt gegen

durch Kältestreß verursachte Magenulcera. Ein großer Teil der Effekte ist wohl auf die Wechselwirkung mit dem dopaminergen System zurückzuführen (200, 218), Neurotensin wirkt hierbei im allgemeinen dem Dopamin entgegen und imitiert Effekte, die durch Neuroleptika ausgelöst werden können. Neurotensin beeinflusst auch die Hypothalamus-Hypophysen-Achse (263), so wird die Freisetzung von Prolaktin und Luteinisierungshormon nach intracerebroventrikulärer Gabe vermindert.

Im Gastrointestinaltrakt beeinflusst Neurotensin Motorik, Sekretion, Durchblutung und Trophik. In vitro löst es an Rattenmagenfundus (219), Ileum (258, 269), und Taenia coli (58, 269) des Meerschweinchens sowie am Menshencolon (66) Kontraktionen aus, dagegen wird Duodenum und Ileum der Ratte (269) sowie Hundemagencorpus relaxiert (263). Das vorkontrahierte Meerschweinchenileum zeigt eine biphasische Reaktion (154, 269), bestehend aus einer kurzen Relaxation gefolgt von einer Kontraktion. Die Ringmuskulatur des Meerschweinchenileums wird relaxiert (103).

Im Intestinaltrakt führt Neurotensin in vivo im allgemeinen zur Hemmung der peristaltischen Motilität. Je nach Spezies, Applikationsform und Nahrungszustand kann es zur Umstellung von für den Nüchternzustand charakteristischer Motorik auf solche, wie sie nach der Nahrungsaufnahme auftritt ("fed pattern") führen (3, 322), die Dauer des "fed pattern" verkürzen (27), die Motilität im Colon verstärken (12, 27) und im Dünndarm hemmen (251). Unter physiologischen Bedingungen im Blut auftretende Konzentrationen hemmen die Magenmotilität und den Tonus des unteren Ösophagusphinkters (89).

Neurotensin stimuliert die Elektrolytsekretion des Pankreas und hemmt die Magensäureproduktion. Dabei besteht teilweise ein Synergismus mit Sekretin (92). Die Anionensekretion im Darm wird stimuliert (190). Außerdem fördert Neurotensin die Durchblutung des Darms und hemmt die des Magens (92, 122). An Pankreas und Antrum hat Neurotensin auch trophische Effekte

(90).

Im kardiovaskulären System wurde schon bei Entdeckung der hypotensive Effekt des Neurotensins bei i.v. Gabe an der anästhesierten Ratte beschrieben (41), der sich später auch auch bei Kaninchen, Schwein, Ziege und Hund zeigen ließ. Meerschweinchen, Waldmurmeltier, Schaf und Katze hingegen reagieren mit einem biphasischen pressorisch-depressorischen Effekt (263). Der hypotensive Effekt ist anscheinend abhängig von der Histaminfreisetzung aus Mastzellen (236); mit dem Mastzelldegranulator compound 48/80 vorbehandelte Ratten zeigen auf Neurotensin Blutdruckanstieg (221). Am Meerschweinchenatrium wirkt Neurotensin positiv ino- und chronotrop (219).

An verschiedenen Gefäßbetten hat Neurotensin variable Effekte in vivo und in vitro. Es führt zu einer Umverteilung des Blutflusses vom Fettgewebe in den Gastrointestinaltrakt (122). Die Koronararterie (220) und Pfortader (123, 234, 237) der Ratte wird kontrahiert, und an der perfundierten Hinterpfote der Ratte kommt es zu einer Zunahme des Gefäßwiderstandes, die mastzellabhängig ist (148).

1.3.4. Rezeptoren

Eine genaue Einteilung der Neurotensinrezeptoren ist zur Zeit noch nicht möglich. In den allermeisten biologischen Tests, insbesondere in den ausführlich untersuchten in-vitro-Präparationen glattmuskulärer Organe zeigen Fragmente und Analoga von Neurotensin ähnliche Aktivitäten (237). NT 9-13 ist das kleinste, noch aktive C-terminale Fragment, N-terminale Fragmente sind nahezu inaktiv. (237). Bindungsstudien ergaben größtenteils eine gute Parallelität von Bindung und biologischer Aktivität (154, 156). Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Untersuchungen übersteigen jedoch das Maß, das bei einem einheitlichen Rezeptor zu erwarten wäre, so daß wohl mehrere ähnliche, noch nicht genau charakterisierte Rezeptoren die Effekte vermitteln (29). Dafür spricht auch, daß an Position 11 substituierte Analoga wie D-Trp¹¹-NT und Tyr(Me)¹¹-NT in

einigen Präparationen, z.B. Rattenkoronararterien (220), Rattenpfortader (234) als Antagonisten wirken, in anderen, z.B. Meerschweinchenatrium, Rattenmagenfundus nicht (237).

Zur Erklärung einiger Effekte die durch N-terminale, aber nicht durch C-terminale Fragmente ausgelöst werden, wie die Miosis bei Applikation im Kammerwasser (126) und der cytoprotektive Effekt bei Kältestreßmagenulzera (125), muß wohl zusätzlich noch ein deutlich anderer Rezeptor angenommen werden.

An Mastzellen beschrieb Lazarus (173, 174) eine Neurotensin-Bindungsstelle, die sich klar von der sonst beschriebenen unterscheidet: Es sind deutlich höhere Konzentrationen zur Bindung notwendig (173), und es besteht eine Kompetition zwischen Bradykinin und Neurotensin (174). Möglicherweise handelt es sich um eine eher unspezifische Bindungsstelle, die die für Peptide mit mindestens zwei basischen Aminosäuren beschriebenen Effekte (138) an Mastzellen vermittelt.

1.3.5. Metabolismus von Neurotensin

Über die Synthese von Neurotensin ist derzeit noch wenig bekannt, es wurden noch keine Vorläuferpeptide und keine m-RNA isoliert. Bei der sauren Extraktion von Magenhomogenaten werden Neurotensin ähnelnde, aber nicht identische Substanzen freigesetzt, und es gibt Hinweise, daß dabei ein Vorläuferprotein von Molekulargewicht 60 000 existiert (35). Neurotensin gehört somit möglicherweise wie Bradykinin und Angiotensin zu den Peptiden, die durch Abspaltung von wesentlich größeren Proteinen entstehen.

Neurotensin wird rasch von Synaptosomen abgebaut, Hauptspaltprodukte sind dabei NT 1-8 und 9-13 bei Spaltung durch nicht membrangebundene Enzyme und NT 1-10 und 1-11 bei Spaltung durch membranständige Enzyme (187). Die Existenz einer spezifischen "Neurotensinase" ist nicht gesichert und eher unwahrscheinlich, da Neurotensin durch eine Reihe von Peptidasen wie Kininase II = Angiotensin-converting enzyme (262), neutrale Endopeptidase =

"Enkephalinase" (262) und Kininase A und B (32) abgebaut werden kann.

1.4. Ziel der vorliegenden Untersuchung

Wie oben dargestellt sind Bradykinin und Neurotensin im Organismus weit verbreitet, die Abklärung ihrer funktionellen Bedeutung jedoch noch nicht vollständig abgeschlossen. Bei beiden Peptiden erscheint eine Rolle bei der Kreislaufregulation wahrscheinlich: Bradykinin beeinflusst die Gefäßmotorik und -permeabilität in zahlreichen Regionen des Körpers, Neurotensineffekte sind anscheinend weniger ausgeprägt, es werden jedoch zahlreiche Gefäße von Neurotensin-immunoreaktiven Nervenfasern innerviert.

Ergebnisse zum Effekt von Neurotensin und Bradykinin am Gehirnkreislauf waren vor dieser Untersuchung spärlich und beschränkten sich auf in-vitro-Modelle. Wie schon in den vorherigen Abschnitten dargestellt, lassen sich im Gehirn sowohl eine Neurotensininnervation der Gefäße als auch ein Gewebs-Kallikrein-Kinin-System nachweisen; zahlreiche Peptidasen sind in der Lage, Neurotensin und Bradykinin abzubauen. Da somit alle für eine mögliche Regulation der cerebralen Durchblutung durch Neurotensin oder Bradykinin notwendigen Komponenten vorhanden sind, war es ein Ziel dieser Untersuchung, festzustellen, in wieweit Neurotensin und Bradykinin die zerebrale Vasomotorik beeinflussen. Außerdem wurde geprüft, welche Bedeutung Kininase II für den Bradykinineffekt hat.

Zweites Ziel war, parallel zu den in-situ-Untersuchungen an Hirngefäßen der Katze in vitro am Meerschweinchenileum, einem aus der Literatur bekannten Präparat für entsprechende biologische Meßverfahren, die biologische Aktivität von Neurotensin und Bradykinin in den verwendeten Chargen zu testen. Da in den in-situ-Versuchen kein Effekt von Kininase II Inhibitoren auf den Bradykinineffekt nachzuweisen war, schien es außerdem unerlässlich, die bekannte Bradykininpotenzierung in einem hierfür etablierten Modell, dem Meerschweinchenileum, in

parallelen Versuchen nachzuvollziehen, um die Besonderheit der Ergebnisse in situ zu untermauern. Ferner wurde die Haltbarkeit von Peptidlösungen an einem Versuchstag und der Einfluß verschiedener Modalitäten der Applikation von Substanzen untersucht.

Drittes Ziel war, die Abhängigkeit des Neurotensineffekts von der Tierspezies und der Lokalisation der glatten Muskulatur zu untersuchen. Um einen Einfluß der Tierspezies zu prüfen, wurden die Effekte von Neurotensin auf die Pfortader von Ratte und Meerschweinchen untersucht. Hierbei wurden erstmalig die Effekte von Neurotensin auf die Meerschweinchenpfortader beschreiben. Der Einfluß der Lokalisation der glatten Muskulatur auf den Neurotensineffekt ließ sich aus einem Vergleich der Daten ablesen, die an Ileum und Pfortader des Meerschweinchens erzielt wurden.

Teilergebnisse dieser Untersuchung wurden schon an anderer Stelle veröffentlicht (291, 292, 300, 301, 302, 333).

2. Methodik

2.1. Präparation der glattmuskulären Organe

2.1.1. Präparation des Meerschweinchenileums (MI)

Meerschweinchen von 300 - 500 g wurden durch Nackenschlag getötet. Anschließend wurde die Bauchwand und das Peritoneum eröffnet und eine kleine Menge Krebslösung A (20 °C) in die Bauchhöhle eingespritzt. Dann wurde der Übergang des Cäcums in das Colon und von dort aus das terminale Ileum aufgesucht. Nach Durchschneiden des Ileums etwa 1 cm proximal vom Cäcum wurde es durch vorsichtigen Zug vom Mesenterium getrennt, im Abstand von ca. 15 cm vom Restileum abgeschnitten und mit Krebslösung durchspült, bis die Spülflüssigkeit klar war. Der makroskopisch saubere Darm wurde in Krebslösung A aufbewahrt. Dann wurden die distalen zwei Zentimeter verworfen und Ileum-Stücke von 1,5 bis 2 cm Länge an beiden Enden mit Seidenfäden zugebunden und schnellstmöglich im 8 ml Organbad befestigt.

2.1.2. Präparation der Meerschweinchenpfortader (MP)

Nach Töten des Meerschweinchen durch Nackenschlag wurde die Bauchhöhle weit eröffnet und der Leberhilus aufgesucht. Anschließend wurde die Pfortader bis zur mesenterialen Aufzweigung verfolgt, an beiden Enden abgebunden und unter dem Operationsmikroskop vorsichtig aus dem sie umgebenden Fettgewebe herauspräpariert. Dabei wurden kleine abzweigende Gefäße durchtrennt. Während der gesamten Präparation wurde das Austrocknen des Gefäßes durch wiederholtes Überspülen mit Krebslösung C (20 °C) verhindert. Abschließend wurde das Gefäß im Organbad befestigt.

2.1.3. Präparation der Meerschweinchenpfortaderlängsstreifen (MP-LS)

Die Präparation erfolgte wie unter 2.1.2 beschrieben, es wurde jedoch wie bei Rioux et al. (234) ein aus einer zugeschmolzenen Glaskapillare hergestellter Glasstab in die Pfortader einge-

führt, um sie anzuheben und so besser vom umgebenden Gewebe freipräparieren zu können, und anschließend wurde sie in ca. 1 mm breite Streifen geschnitten, die oben und unten mit Seide umschlungen und im Organbad befestigt wurden. Als Badlösung wurde Krebslösung B benutzt.

2.1.4. Präparation der Rattenpfortader (RP)

Ratten von 200 - 300 g wurden mit Nackenschlag getötet. Anschließend wurde die V. portae analog zu 2.1.2. dargestellt und präpariert.

2.1.5. Präparation der Rattenpfortaderlängsstreifen (RP-LS)

Nach Tötung der Ratte, wie unter 2.1.4. beschrieben erfolgte die Präparation analog zu 2.1.3.

2.1.6. Fixierung der Präparate im Organbad und Messung der isometrischen Kontraktion

Es wurden 8 ml Organbäder benutzt, deren Aufbau in Abb. 2.1 dargestellt ist. Sie bestehen aus einem Unterteil, durch das die Zufuhr von frischer Lösung und die Begasung erfolgt, und einem Oberteil, das als eigentliches Organbad im wesentlichen ein Zylinder mit doppelter Wand ist. Die Temperatur (37 °C) der Lösung im Oberteil wird durch die Warmwasserummantelung konstant gehalten. Überlaufende Lösung wird durch den Sog einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Zum Einbringen der Präparate wurde zunächst das Oberteil des Organbads abgenommen und das eine Ende des Präparats mit einem Seidenfaden an einem Bügel festgebunden, der an der Fritte des Organbades angebracht ist. Anschließend wurde das Oberteil aufgesetzt und mit Lösung gefüllt. Der Faden am freien Ende des Präparats wurde an eine Öse geknotet und damit an einem Kraftaufnehmer (Hottinger Q11/50) befestigt. Gemessen wurden isometrische Kontraktionen, die mittels Hottinger-Verstärker (IG 2613) und eines Servogor-Schreibers aufgezeichnet wurden.

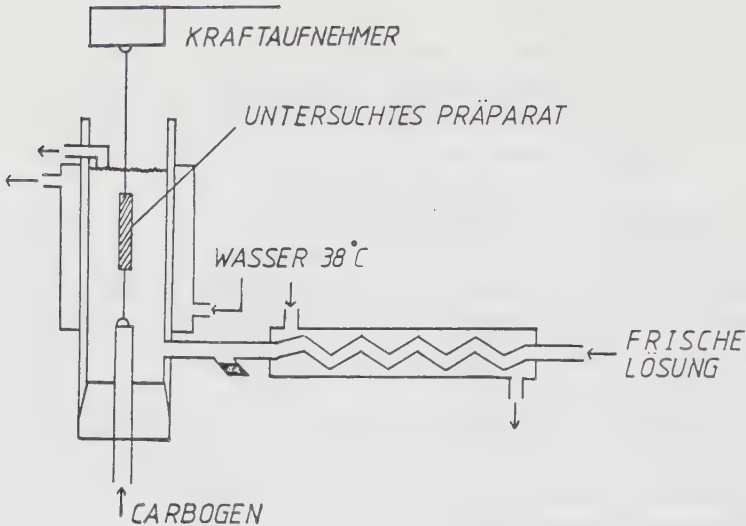


Abbildung 2.1

Aufbau des Organbads (Schema)

Die Lösungen zum Spülen wurden bei Zimmertemperatur mit Carbogen (95% O_2 und 5% CO_2) begast und vor Einleitung in das Organbad über eine Wärmespirale und einen Thermostaten auf 38 °C temperiert. Während der gesamten Versuche wurden die Organbäder mit Carbogen begast. Die Zugabe der Testlösungen erfolgte von oben mittels Glaspipetten in Volumina von 50 μl (Neurotensin) bzw. 80 μl (Bradykinin). In Ausnahmefällen wurden auch Volumina bis zu 0,5 ml zugegeben. Glaspipetten und Organbäder wurden vor Versuchsbeginn mit einem Vernetzer (VP 1405, Wacker) silikonisiert, um eine Adsorption der Peptide zu verhindern.

2.2. Herstellung und Aufbewahrung der Verdünnungen der Testsubstanzen

Die Testsubstanzen wurden mit einer Mikrowaage (Sartorius 4501 Micro) auf Schiffchen aus Aluminiumfolie gewogen, anschließend zunächst in Aqua dest. aufgelöst und dann mit derselben Menge

doppelt konzentrierter Lösung D gemischt. Zur weiteren Verdünnung diente Lösung D (Normalkonzentration). Sämtliche Lösungen wurden mit Eis auf 0 °C gekühlt und mit 5% CO₂, 95% N₂ begast, um eine Oxidation zu verhindern, Testsubstanzen zusätzlich vor Licht geschützt. Die Testlösungen wurden in Polystyrolröhrchen aufbewahrt.

2.3. Durchführung der Messungen

2.3.1. Prinzipieller Ablauf der Versuche

Nach Einhängen der Präparate wurde ihnen eine Vorspannung von 18 mN (Meerschweinchenpfortader) bzw. 7,5 mN (alle anderen Präparate) gegeben. Anschließend wurden sie über 30 min von 20 auf 37 °C erwärmt und über 1 - 1,5 h alle 15 - 20 min gespült. Messung mit einem Quecksilberthermometer zeigte, daß die Temperatur in den Organbädern 37,0 bis 37,3 °C betrug, solange nicht gespült wurde. Zu Beginn des Spülvorgangs sank sie zunächst über wenige Sekunden auf 35,3 bis 35,6 °C ab und lag während des weiteren Spülvorgangs zwischen 36,6 und 36,9 °C.

Nachdem die Präparate eine konstante Spontanmotorik zeigten, wurden nichtkumulative Dosis-Wirkungs-Kurven gewonnen, indem die Testlösungen in ansteigender Konzentration beginnend mit der Lösung D ohne Testsubstanz in das Organbad gegeben und über 2 min mit den Präparaten in Kontakt gelassen wurden. Dann wurde über 1 min gespült und im Abstand von 10 min (Bradykinin) bzw. 15 - 30 min (Neurotensin) eine höhere Konzentration gegeben. Nach Abschluß einer Dosis-Wirkungs-Kurve wurde mehrmals gespült.

In Vorversuchen mit Farbstoff wurde festgestellt, daß sich die Testlösung bei Applikation von oben innerhalb von Sekunden gleichmäßig im Organbad verteilt und nach 1 min vollständig herausgespült ist.

2.3.2. Die einzelnen Versuchsprotokolle

Im einzelnen wurden folgende Versuche durchgeführt:

2.3.2.1. Versuche zur Prüfung der Haltbarkeit von Bradykinin am Meerschweinchenileum

Vergleich von frisch hergestellten Bradykinin-(BK)-Verdünnungen mit 5 h aufbewahrten Verdünnungen: Gemessens wurde je eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit folgender Applikationsreihenfolge: Lösungsmittel (Lösung D) ohne Bradykinin, BK 10^{-9} M, BK 10^{-8} M, BK 10^{-7} M und BK 10^{-6} M, in einem Teil der Experimente zunächst die frischen, in einem anderen Teil zunächst die 5 h alten Lösungen, die unter Begasung mit 95%N₂/5%CO₂ in Eis aufbewahrt worden waren. In einem Teil der Versuche wurden keine vollständigen Dosis-Wirkungs-Kurven aufgenommen, sondern außer dem Lösungsmittel nur folgende Konzentrationen gegeben: 10^{-8} M - 10^{-6} M bzw. 10^{-7} M - 10^{-6} M.

2.3.2.2. Vergleich verschiedener Bradykininchargen am Meerschweinchenileum

Es wurde Bradykinin von Serva mit Bradykinin von Bachem verglichen. Dazu wurden die Konzentrationen $0,5 \times 10^{-8}$ M, 10^{-8} M und 2×10^{-8} M mehrmals wiederholt in variabler Reihenfolge appliziert.

2.3.2.3. Versuche zur Wirkung von Kininase II Inhibitoren auf den Bradykinineffekt am Meerschweinchenileum

Es wurde zunächst eine Bradykinin-Dosis-Wirkungs-Kurve in der Reihenfolge Lösungsmittel, 10^{-9} M BK, $0,5 \times 10^{-8}$ M BK, 10^{-8} M BK, 2×10^{-8} M BK, 10^{-7} M BK, 10^{-6} M BK gemessen,

in einem Teil der Versuche wurden nur folgende Konzentrationen von BK gegeben: $0,5 \times 10^{-8}$ M, 10^{-8} M, 2×10^{-8} M. Anschließend wurde erneut eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit den gleichen Bradykininkonzentrationen aufgenommen, wobei entweder 2 min vorher mit einem Kininase II Inhibitor vorinkubiert wurde ("sequentielle Messung") oder der Kininase II Inhibitor simultan mit Bradykinin

gegeben wurde ("simultane Messung"). Dabei wurden folgende Konzentrationen gegeben:

Sequentielle Gabe: Captopril	10^{-7}M
Simultane Gabe: Captopril	10^{-7}M
Captopril	$0,5 \times 10^{-6}\text{M}$
Bradykinin Potentiator C	10^{-6}M

2.3.2.4. Versuche zur Wirkung von Neurotensin (NT) am Meerschweinchenileum

Es wurden Dosis-Wirkungs-Kurven mit folgender Applikationsreihenfolge aufgenommen: Lösungsmittel, $1,9 \times 10^{-10}\text{M}$ NT, $3,8 \times 10^{-10}\text{M}$ NT, $7,5 \times 10^{-10}\text{M}$ NT, $1,5 \times 10^{-9}\text{M}$ NT, $3 \times 10^{-9}\text{M}$ NT, $6 \times 10^{-9}\text{M}$ NT, $1,2 \times 10^{-8}\text{M}$ NT, $6 \times 10^{-8}\text{M}$ NT, $6 \times 10^{-7}\text{M}$ NT, bei einem Teil der Versuche wurde noch $6 \times 10^{-6}\text{M}$ NT als höchste Konzentration hinzugenommen. Zusätzlich wurde Carbachol $6 \times 10^{-6}\text{M}$ und Noradrenalin $6 \times 10^{-7}\text{M}$ bzw. $1,2 \times 10^{-5}\text{M}$ gegeben.

2.3.2.5. Versuche zur Wirkung von Neurotensin an der Meerschweinchenpfortader

Die Messung erfolgte analog zu 2.3.2.4. Zusätzlich wurden einige Versuche nur mit den höheren Konzentrationen durchgeführt.

2.3.2.6. Versuche zur Wirkung von Neurotensin an Rattenpfortader und Längsstreifen der Pfortadern von Ratte und Meerschweinchen

Hier wurden nur Konzentrationen im Bereich $6 \times 10^{-9}\text{M}$ - $6 \times 10^{-6}\text{M}$ NT gemessen. Zwischen den einzelnen Applikationen bestand eine Pause von 30 min.

2.4. Auswertung der Messungen

Am Meerschweinchenileum wurde die Differenz des Basistonus vor

und nach Gabe der Substanzen gemessen, wobei über einen Zeitraum von 10 s gemittelt und der maximale Effekt innerhalb von 2 min nach Substanzapplikation gemessen wurde (Abb. 2.2).



Abbildung 2.2

Auswertung am Darm: Die Zunahme der Kraftentwicklung (F) nach Bradykininapplikation ergibt sich aus der Differenz von Basistonus vor und nach Substanzapplikation

Verworfen wurden Versuche, in denen es zu solch starken Schwankungen der Basallinie oder zu einer solchen Häufung hoher phasischer Kontraktionen kam, daß eine Auswertung nicht mehr möglich war.

Zusätzlich wurden folgende Parameter bei einem Teil der Versuche bestimmt:

- Maximale Kraftentwicklung vor und nach Substanzapplikation
- Mittlere Kraftentwicklung vor und nach Substanzapplikation
- Niedrigste Kraftentwicklung 10 s vor und 10 s nach Substanzapplikation (Die Differenz ergab die "initiale Relaxation" Abb.2.3)

An den Pfortaderpräparationen wurde die Differenz der niedrigsten Kraftentwicklung 2 min vor und nach Substanzapplikation (Abb. 2.4), zusätzlich die Frequenz der Kontraktionen und die phasischen Kontraktionsmaxima gemessen.

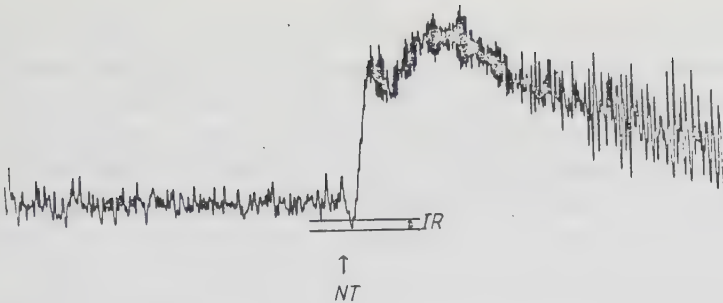


Abbildung 2.3

Messung der initialen Relaxation (IR) nach Gabe von Neurotensin (NT)

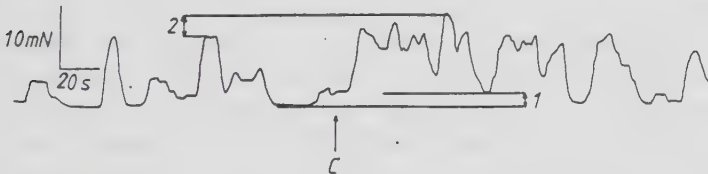


Abbildung 2.4

Auswertung an der Pfortader. 1: Änderung des Basaltonus 2: Änderung der phasischen Kontraktionsmaxima C: Carbachol

2.5. In-situ-Versuche an Hirnarterien der Katze

Wie in einer gemeinsamen Publikation mit Wahl et al. (301) beschrieben, wurden Katzen beiderlei Geschlechts (2,6 - 4,5 kg Körpergewicht) mit Alpha-Chloralose (40 - 50 mg/kg i.v.) betäubt und mit Gallamin (15 - 20 mg/kgxh i.v.) relaxiert. Sie wurden mit einem Bird Mark 8 Respirator künstlich beatmet. Die Ventilation wurde so eingestellt, daß der arterielle PCO_2 der Versuchstiere dem von wachen Katzen entsprach. Arterieller pH, PCO_2 und PO_2 wurden bei 38 °C mit Radiometer Analysator (BEU1 und BMS2) im Blut aus der A. femoralis gemessen. Der arterielle PCO_2 lag nahe dem bei nicht narkotisierten Katzen gemessenen (124). Endexpiratorisches CO_2 (Minhardt Capnolyser), Blutdruck (Druckaufnehmer P50 (Gould) und Servomed Verstärker Hellige) und Körpertemperatur (Temperaturfühler ETW MET 531) wurden laufend mit einem Watanabe Multicorder aufgezeichnet; nur Katzen mit einem arteriellen Mitteldruck von mehr als 100 mm Hg wurden für

die Experimente benutzt. Tyrode-Lösung (1,7 ml/kgxh) wurde zum Ausgleich der Flüssigkeitsverluste während des Experiments mit einem Braun Perfusor Secura infundiert. Nach Fixierung des Schädels in einem Kopfhalter wurde die Kalotte mit einem mit Tyrodelösung gekühlten Zahnarztbohrer in einem Areal von 2x1 cm eröffnet. Hirn und Dura wurden mit einer 1 - 2 cm dicken, auf 37 - 38 °C temperierten Paraffinölschicht (Paraffinum subliquidum DAB 8) bedeckt und anschließend die Dura unter einem Operationsmikroskop (Zeiss) nach mikrochirurgischer Ligatur der sichtbaren Gefäße entfernt. Der Durchmesser der Arterien und Arteriolen des Parietallappens wurde mit einer image-splitting-Methode unter Verwendung eines Bausch and Lomb stereo-zoom-Mikroskops, einer 625-Zeilen-Fernsehkamera von Grundig und eines Mehrkanalschreibers (Watanabe) gemessen. Lösung D ohne und mit Testsubstanz, die wie bei den in-vitro-Versuchen hergestellt war, wurde direkt vor Gebrauch in silikonisierte Glaskapillaren mit angeschliffener Spitze (Außendurchmesser 8 - 10 μm) gefüllt. Die Spitze der Kapillare wurde mit einem Mikromanipulator (Leitz) durch die oberflächliche Schicht der Arachnoidea-Membran bis in den perivaskulären Raum des zu untersuchenden Gefäßes vorgeschoben. 5 μl der jeweiligen Testlösung wurden mit einer Mikroperfusionspumpe innerhalb von 40 s in den Perivaskulärraum injiziert. Der Durchmesser der Gefäße wurde vor sowie 20 und 40 s nach Applikation der Substanz gemessen, der Mittelwert der letzten beiden Werte zur Auswertung benutzt.

Versuchsprotokoll:

Vor den eigentlichen Messungen wurde die Reaktivität der Gefäße auf Änderungen des pH getestet (169, 298). Anschließend wurde zunächst Lösung D, dann Testsubstanz in Lösung D appliziert, wobei in einem Teil der Versuche Dosis-Wirkungs-Kurven, in einem Teil die Effekte auf Einzelkonzentrationen gemessen wurden. Zur Beurteilung des Bradykinineffekts wurde Bradykinin in den Konzentrationen 10^{-13}M , 10^{-11}M , 10^{-8}M , 10^{-7}M , 10^{-6}M , 10^{-5}M , 10^{-4}M eingesetzt. Der Eigeneffekt der Kininaseinhibitoren Captopril und Bradykinin Potentiator C wurde in den Konzentrationen 10^{-10}M , 10^{-8}M , 10^{-6}M , 10^{-5}M , 10^{-4}M und 10^{-3}M (nur Captop-

pril) getestet. Um zu untersuchen, in wie weit Kininase II Inhibitoren den Bradykinineffekt beeinflussen, wurde Bradykinin in den Konzentrationen 10^{-8}M , 10^{-7}M , 10^{-6}M und 10^{-5}M allein oder mit simultaner Gabe von 10^{-5}M Captopril oder 10^{-5}M Bradykinin Potentiator C getestet. Um den Effekt von Neurotensin auf zu untersuchen, wurde dieses in den Konzentrationen $6 \times 10^{-12}\text{M}$, $6 \times 10^{-10}\text{M}$, $6 \times 10^{-8}\text{M}$, $6 \times 10^{-7}\text{M}$, $6 \times 10^{-6}\text{M}$ und $6 \times 10^{-5}\text{M}$ appliziert.

2.6. Zusammensetzung der Lösungen

Lösung	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	H_2PO_4^-	SO_4^{2-}	HCO_3^-	Glukose
A	159	6,5	1,3	-	136	1,3	1,3	27,8	6,2
B	143	5,9	1,2	2,5	128	1,2	1,2	25	5,6
C	137	5,9	1,2	2,5	134	1,2	-	14	11,5
D	159	2,5	-	1,5	150,5	-	-	14,5	-

2.7. Benutzte Substanzen

Bradykinintriacetat	Serva, Bachem
Neurotensin	Serva
Noradrenalin-Hydrochlorid	Sigma
Carbamoylcholin-Hydrochlorid	Merck
Captopril	Squibb
Bradykinin Potentiator C	Peninsula

2.8. Statistische Auswertung

Die angegebenen Werte sind Mittelwert $\pm$ Standardfehler des

Mittelwerts. In einigen Fällen wurden auch Medianwerte berechnet (Der Medianwert ist der Wert, den man erhält, wenn man die Meßwerte der Größe nach ordnet und den in der Mitte stehenden (bzw. den Mittelwert der beiden mittleren) herausucht. In den Fällen, in denen einige wenige sehr große oder sehr kleine Meßwerte vorkommen, repräsentiert er die Mehrzahl der Werte besser als der arithmetische Mittelwert). Für die Abbildungen wurde jeweils der Lösungsmittteleffekt abgezogen.

Der verteilungsfreie L-Test von Page (211) und der normal-scores-Test von Pirie (215) unter Benutzung von Tafeln von Teichrow (271) wurden zur Feststellung eines signifikanten Trends benutzt. r_{av} , ein nichtparametrisches Analogon zum Korrelationskoeffizienten, wurde mittels der von Page (211) gegebenen Formel berechnet.

Parametrische Vergleiche verschiedener Effekte erfolgten mittels Varianzanalyse (249) und Scheffé-Test (253). Zum Vergleich einander entsprechender Konzentrationen wurde der t-Test für Paardifferenzen benutzt (249), die Einhaltung der multiplen Signifikanzniveaus wurde durch die Korrektur nach Bonferroni-Holm sichergestellt (128).

Vertrauensbereiche für scheinbare Aktivitäten wurden mittels Sechs-Punkt-Schätzung für parallele Geraden in einem Versuchsplan mit randomisierten Blöcken berechnet (48).

3. Ergebnisse

3.1. In-vitro-Versuche

3.1.1. Ergebnisse am terminalen Meerschweinchenileum

3.1.1.1. Die Spontanmotorik des Darms

Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen zeigten die Präparate des terminalen Ileums schnelle spontane Kontraktionen mit einer Frequenz von ca. 13/min und einer mittleren Stärke von ca. $4,15 \pm 0,44$ mN. Beim Spülen und gelegentlich auch spontan traten außerdem ca. $16 \pm 2,8$ s anhaltende Kontraktionen von ca. $24,6 \pm 2,93$ mN Stärke auf; im Anschluß an diese war die Stärke der spontanen Kontraktionen vom ersten Typ zeitweilig vermindert (siehe Abb. 3.1).

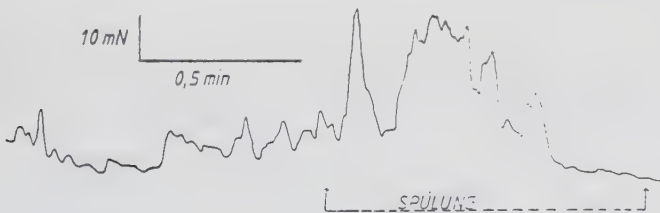


Abbildung 3.1

Effekt des Spülens auf die Kraftentwicklung des Meerschweincheileums
(Originalregistrierung, nachgezeichnet)

3.1.1.2. Der Lösungsmittelleffekt

Die Zugabe von Lösung D führte am Meerschweinchenileum nur zu einer minimalen Zunahme der basalen Kraftentwicklung ($0,745$ mN $\pm 0,158$ mN, $n=84$). Bei der statistischen Auswertung wurden die nur durch Lösung D hervorgerufenen Effekte als Kontrollgruppe ("Leerwerte") mitgeführt, in den Zeichnungen sind sie jeweils abgezogen.

3.1.1.3. Der Effekt von Bradykinin (BK) am Meerschweinchenileum

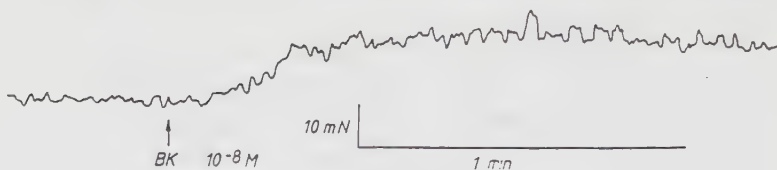


Abbildung 3.2

Effekt von Bradykinin (BK) auf die Kraftentwicklung des Meerschweinchen-ileums (Originalregistrierung, nachgezeichnet)

Die Gabe von Bradykinin führte zu dosisabhängigen Kontraktionen, die innerhalb des Meßintervalls von 2 min ihren Maximalwert erreichten. Eine typische Originalregistrierung ist in Abb. 3.2 wiedergegeben. Wie aus Tabelle 3.1 hervorgeht, traten die Kontraktionen um so früher auf ($P < 0,001$, $r_{av} = 0,906$) und erreichten um so früher ihr Maximum ($P < 0,001$, $r_{av} = 0,844$), je höher die benutzte Bradykinin-Konzentration war. Die Kontraktionskraft betrug bei $10^{-6}M$ BK nach Abzug des Lösungsmittel-effekts $35,07 \pm 1,86$ mN, die Halbwirkdosis EC_{50} $1,62 \times 10^{-8}M$. Der der EC_{50} zugeordnete negative dekadische Logarithmus, der pD_2 , beträgt 7,79. ($n=46$, errechnet aus den Versuchen mit frisch zubereiteter Bradykininlösung (2.4.2) und den Bradykinin-Dosis-Wirkungs-Kurven vor Applikation eines Kininase II Inhibitors (2.4.4)).

Bei wiederholter Gabe (bis 3 mal) der gleichen Bradykinindosis wurde unter den benutzten experimentellen Bedingungen jeweils wieder der gleiche Effekt erzielt, so daß sich keine Anzeichen für eine Tachyphylaxie fanden. Bei den benutzten Meßintervallen war die Spontanmotorik zu Beginn jeder Messung weitgehend mit der anfänglich beobachteten identisch.

Tabelle 3.1

Zeitdauer von der Bradykininapplikation bis zum ersten Auftreten (t_{ea}) bzw. Maximum (t_{max}) der Kontraktion des Meerschweinchenileums

Konzentration	n	t_{ea}	t_{max}
10^{-8} M BK	15	17,5 s	66,0 s
10^{-7} M BK	18	9,3 s	28,2 s
10^{-6} M BK	25	7,2 s	17,0 s

Die angegebenen Werte sind geometrische Mittelwerte. t_{ea} : Zeit bis zum ersten Auftreten der Kontraktion; t_{max} : Zeit bis zur maximalen Kontraktion; BK: Bradykinin

3.1.1.3.1. Prüfung der Haltbarkeit von Bradykininlösungen

Um festzustellen, ob innerhalb von 4-5 h ein relevanter Abfall der biologischen Aktivität von Bradykinin in den Lösungen unter den in 2.2 beschriebenen Aufbewahrungsmodalitäten auftrat, wurde der Effekt frisch zubereiteter Lösungen mit dem 5 h aufbewahrter verglichen (s.a. 2.3.2.1.). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 der Applikationsart entsprechend zusammengestellt.

Für die frisch angesetzte Bradykininlösung gab es keinen signifikanten Unterschied der Kontraktionskraft ($p < 0,05$ bei Verwendung des t-Tests für nicht gepaarte Beobachtungen und Benutzung der Bonferroni-Holm-Korrektur) in Abhängigkeit davon, ob sie vor oder nach den 5 h aufbewahrten Lösungen getestet wurde (Abb. 3.3a) und ob vollständige Dosis-Wirkungs-Kurven oder Einzelwerte gemessen wurden (Abb. 3.3b). Bei der weiteren Auswertung wurde daher die Unterscheidung nach Applikationsreihenfolge und -art nicht mehr berücksichtigt.

Die mit frisch angesetzter und 5 h aufbewahrter Bradykininlösung erhaltenen Effekte sind in Abb 3.4 dargestellt. Zwischen ihnen besteht offensichtlich kein relevanter Unterschied. In den jeweiligen Dosis-Wirkungs-Kurven ergab die statistische

Effekt von Bradykinin "frisch" und "5 h alt" am Meerschweinchenileum in Abhängigkeit von Applikationsreihenfolge und -art

Applikationsart	-reihenfolge	frisch/alt	Konzentration (M Bradykinin)														
			"leer"		10 ⁻⁹		10 ⁻⁸		10 ⁻⁷		10 ⁻⁶						
			n	x	sem	n	x	sem	n	x	sem	n	x	sem	n	x	sem
10 ⁻⁹ M - 10 ⁻⁶ M	zuerst frisch	frisch	2	0,92	0,31	2	2,95	0,74	2	17,40	6,95	2	30,44	6,46	2	39,36	3,08
		alt	2	0,49	0,31	2	0,80	0,18	2	20,54	4,06	2	32,35	3,32	2	37,52	2,46
	zuerst alt	frisch	6	0,37	0,29	6	1,33	0,51	6	14,72	2,09	6	28,45	2,85	6	32,74	2,66
		alt	6	0,66	0,29	6	1,46	0,74	6	12,40	2,10	6	30,69	2,42	2	41,51	2,77
10 ⁻⁷ M + 10 ⁻⁶ M	zuerst frisch	frisch	3	-0,12	0,12				3	7,63	4,37				3	35,18	10,54
		alt	3	0,04	0,36				3	8,04	4,01				3	40,30	6,92
	zuerst alt	frisch	4	2,24	0,47				4	8,43	4,01				4	40,01	6,33
		alt	4	1,20	0,82				4	8,43	2,97				4	36,16	4,34
10 ⁻⁷ M + 10 ⁻⁶ M	zuerst frisch	frisch	6	0,92	0,27				6	30,46	2,05	6	38,91	2,30			
		alt	6	1,25	0,57				6	30,20	2,42	6	37,78	2,13			
	zuerst alt	frisch	4	0,25	0,13				4	19,31	3,05	4	30,44	4,93			
		alt	4	-0,18	0,37				4	22,29	3,17	4	29,43	3,52			

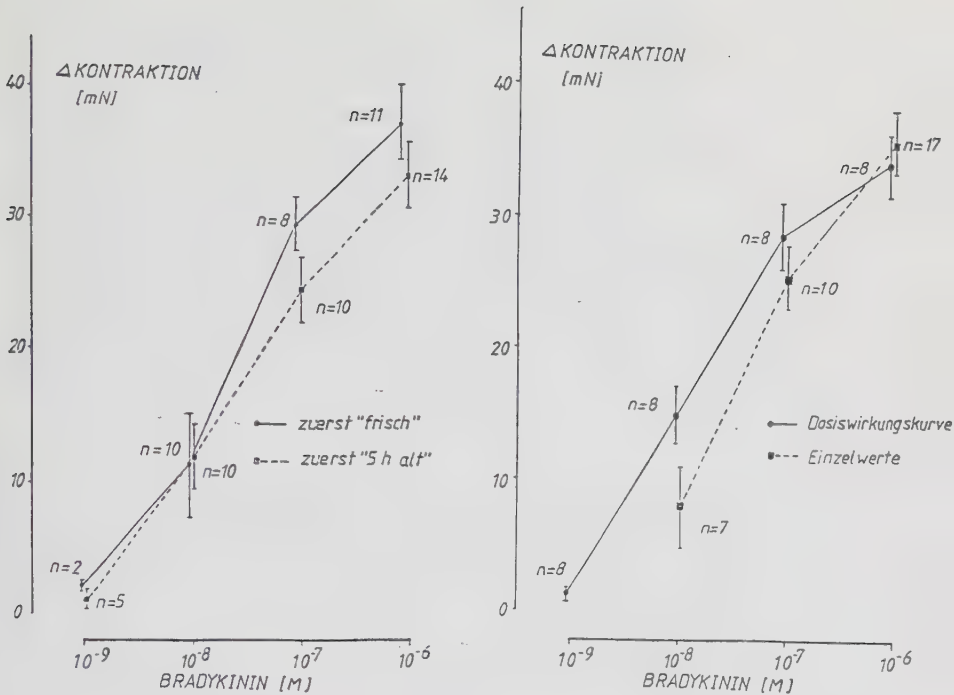


Abbildung 3.3 a

b

- a) Dosis-Wirkungs-Kurve für "frisch" angesetzttes Bradykinin ohne vorherige Gabe von Bradykinin (durchgezogene Linie) und nach vorheriger Gabe von Bradykinin (gestrichelte Linie).
 b) Effekt von "frisch" angesetzttem Bradykinin bei Aufnahme einer vollständigen Dosis-Wirkungs-Kurve (durchgezogene Linie) und bei Gabe von Einzeldosen (gestrichelte Linie)

Auswertung durch Varianzanalyse (nach Transformation wegen ungleicher Varianzen) und Scheffé-Test signifikante ($P < 0,01$) Unterschiede der Effekte der Konzentrationen 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M und 10^{-6} M BK untereinander. Kein signifikanter Unterschied fand sich lediglich zwischen 10^{-7} M BK und 10^{-6} M BK bei 5 h aufbewahrten Lösungen. Bis auf die Konzentration 10^{-9} M BK waren die Effekte signifikant vom Lösungsmittelleffekt unterschieden. Auch der verteilungsfreie normal-scores-Test von Pirie (angewandt auf die Dosis-Wirkungs-Kurven-Werte) zeigte einen signi-

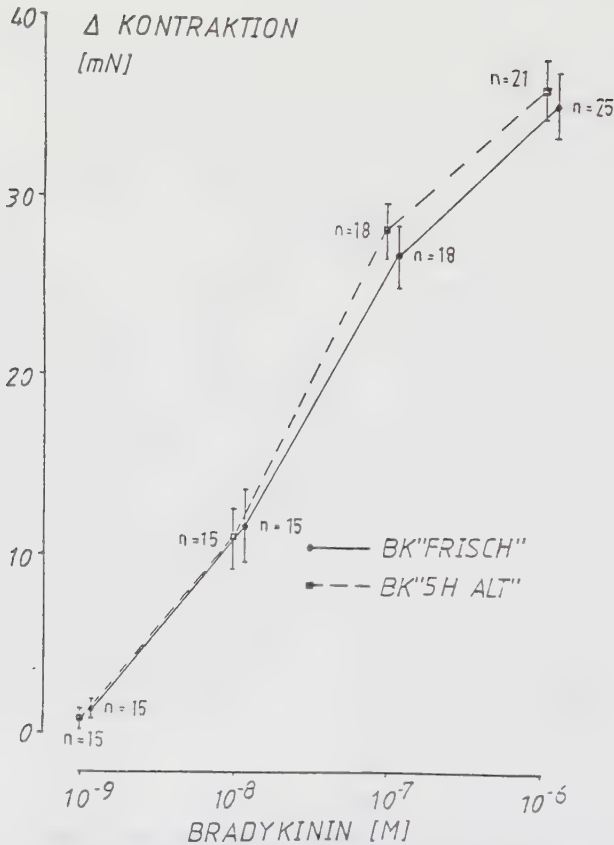


Abbildung 3.4

Vergleich der Kraftentwicklung des Meerschweinchenileums bei Gabe frisch zubereiteter Bradykininlösungen (BK frisch) und fünf Stunden aufbewahrter (BK 5 h alt)

fikanten konzentrationsabhängigen Effekt des Bradykinins ($P < 0,001$; $r_{av} = 0,96$). Varianzanalyse und Scheffé-Test zeigten bei entsprechenden Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Effekten frisch zubereiteter und 5 h aufbewahrter Bradykininlösungen. Zusätzlich wurde der Effekt frischer und 5 h aufbewahrter Lösungen mittels des t-Tests für Paardifferenzen verglichen, auch hier ergaben sich nach Korrektur gemäß Bonferroni-Holm keine signifikanten Unterschiede.

Im Konzentrationsbereich 10^{-9} M BK bis 10^{-7} M BK wurde mittels Wertbemessung aufgrund paralleler Wirkgeraden untersucht, ob Unterschiede zwischen frisch zubereiteter und 5 h aufbewahrter oder zwischen erster und zweiter Dosis-Wirkungs-Kurve bestehen, die relativen Aktivitäten lagen zwischen 0,95 und 1,24 und waren nicht signifikant ($p < 0,05$) von 1 verschieden; insbesondere hatten die 5 h aufbewahrten Lösungen gegenüber den frischen zubereiteten eine relative Aktivität von 1,023. Die Halbwirkkonzentration EC_{50} war bei 5 h aufbewahrten Bradykininlösungen mit $1,3 \times 10^{-8}$ M ($pD_2 = 7,88$) nur unwesentlich von der frischen Lösungen ($1,4 \times 10^{-8}$ M, $pD_2 = 7,85$) verschieden.

3.1.1.3.2. Vergleich verschiedener Bradykinin-Chargen

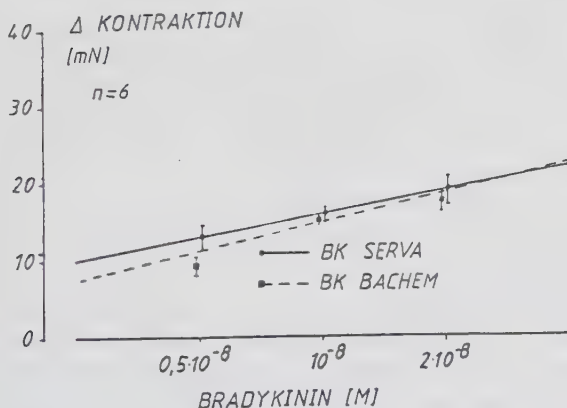


Abbildung 3.5

Vergleich der Effekte des von den Firmen Serva und Bachem hergestellten Bradykinins

Die mit Bradykinin Serva und Bradykinin Bachem erhaltenen Effekte sind in Abb. 3.5 dargestellt. Die Bradykininchargen wurden im Konzentrationsbereich von $0,5 \times 10^{-8}$ bis 2×10^{-8} M BK unter der Annahme linearer, parallel verlaufender Wirkgeraden

verglichen (s. 2.3.2.3.). Es wurde jeweils an 2 Därmen jede Konzentrationen 3 mal gemessen, zwischen den Därmen wurden parallel verschobene Wirkgeraden angenommen (In dem engen Konzentrationsbereich erschienen die Annahmen vertretbar).

Die Annahmen wurden experimentell weitgehend bestätigt: Es gab keine signifikanten Abweichungen von der Linearität ($p=0,57$) oder der Parallelität der Geraden ($p=0,76$). Auch der Unterschied zwischen den beiden Därmen war nicht signifikant ($p=0,64$). Der dosisabhängige Effekt wurde in den signifikanten ($p=0,0001$) Einfluß der untersuchten Konzentration auf das Meßergebnis wiedergespiegelt.

Zwischen den beiden untersuchten Bradykininpräparationen bestand kein signifikanter Wirksamkeitsunterschied ($p=0,10$). Im Vergleich zu Bradykinin-Serva hat Bradykinin-Bachem eine Aktivität von 0,69, das Vertrauensintervall für $P=0,99$ geht von 0,28 bis 1,26, Bradykinin-Serva ist damit etwa so aktiv wie Bradykinin Bachem.

3.1.1.4. Die Veränderung der Bradykinin-Dosis-Wirkungs-Kurve durch Hemmstoffe der Kininase II

Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß Captopril (C) und Bradykinin Potentiator C (PC) bis 10^{-6} M keinen wesentlichen Einfluß auf die Darmmotorik haben, wurde der Einfluß von Captopril 10^{-7} M und $0,5 \times 10^{-6}$ M und Potentiator C 10^{-6} M auf die Bradykinin-Dosis-Wirkungs-Kurve untersucht (vgl. 2.3.2.4.). Um auszuschließen, daß alleine durch die Wiederholung einer Dosis-Wirkungs-Kurve eine Verstärkung des Bradykinin-Effekts auftrat, wurden in einigen Versuchen zwei Dosis-Wirkungs-Kurven für Bradykinin hintereinander aufgenommen, wobei bei der 2. Kurve Lösung D anstelle eines Kininase II Inhibitors gegeben wurde.

Die Ergebnisse sind in Tab. 3.3 zusammengefaßt. Die Dosis-Wirkungs-Kurve mit und ohne Hemmstoff wurde jeweils am gleichen Darm gewonnen, so daß Schwankungen zwischen den Därmen keinen Einfluß auf den potenzierenden Effekt haben können. Der Eigeneffekt der Kininase II Inhibitoren (Abb. 3.6) war gering im Vergleich zum Bradykinineffekt und für $p=0,01$ nicht signifikant von 0 verschieden (t-Test). Bei der graphischen Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven wurde er jeweils abgezogen. Die maximale Kontraktionskraft war mit und ohne Captopril nicht verschieden (gepaarter t-Test, $p=0,01$). Wie Abb. 3.7 zeigt, sind bei zweimaliger Aufnahme der Bradykinin-Dosis-Wirkungs-Kurven die Effekte praktisch identisch. In Gegenwart von Bradykinin Potentiator C kommt es dagegen zu einer sichtbaren Linksverschiebung (Abb. 3.8), die bei Captopril (Abb. 3.9 - 3.11) noch deutlicher ausgeprägt ist. Für jeden Hemmstoff sind die nach Abzug des Eigeneffekts signifikant verschiedenen Effekte in Tab. 3.3 gekennzeichnet (ein Stern: $p<0,05$, zwei Sterne: $p<0,01$), t-Test für Paardifferenzen mit Bonferroni-Holm-Korrektur).

Für die statistische Auswertung wurde im Konzentrationsbereich 5×10^{-9} M BK bis 2×10^{-8} M BK, der im linearen Bereich der Dosis-

Tabelle 3.3

Der Einfluß der Kininase II - Hemmer auf den Bradykinin-Effekt am Meerschweinchenileum

Hemmstoff		n	Lösung D	Bradykinin (M)					
				10 ⁻⁹	0,5x10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	2x10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
C 10 ⁻⁷ M	o	10	0,91±0,69	1,72±0,59	6,08±1,26	13,54±0,94	16,49±1,32	30,44±2,61	36,05±
	m		3,09±1,32	5,82±1,26	17,71±1,54*	23,97±1,35**	28,03±2,65	33,66±3,00	34,96±
C 10 ⁻⁷ M simultane Gabe	o	12	0,75±0,33	2,66±1,29	8,42±1,64	15,34±2,30	20,67±2,54	28,34±2,80	31,45±
	m		1,16±0,67	5,67±2,00	19,19±2,35**	23,08±2,71*	27,58±2,87*	31,68±2,60	32,30±
C 0,5x10 ⁻⁶ M	o	12	0,26±0,44	1,86±0,59	11,04±1,54	16,67±2,12	23,42±2,25	32,31±2,58	37,17±
	m		1,81±0,59	5,06±0,95	22,54±2,76**	30,63±2,00**	35,64±2,16**	38,86±2,47	40,08±
PC 10 ⁻⁶ M	o	9	0,37±0,52	—	6,76±4,00	15,91±3,12	21,11±3,67	—	36,75±
	m		0,97±0,59	—	15,91±3,19	21,94±3,94**	27,65±3,86**	—	—
Lösung D	o	4	0,37±0,21	0,06±0,15	3,80±1,04	8,92±2,65	15,21±4,49	23,48±5,07	28,30±
	m		0,25±0,25	0,67±0,41	4,26±2,16	8,12±3,61	17,04±4,78	21,24±4,70	27,35±

C Carbachol PC Potentiator C o: Werte ohne Hemmstoff m: Werte mit Hemmstoff *: p<0,05 **: p<0,01 (t-Test für Paardifferenzen mit Bonferroni-Holm-Korrektur)

Wirkungs-Kurve liegt, eine Wertbemessung unter der Annahme paralleler Wirkgeraden durchgeführt, wobei für die Därme parallele Wirkgeraden angenommen wurden. Es ergaben sich keine signifikanten Abweichungen von den Annahmen der Linearität und Parallelität (p<0,05). Die erhaltenen scheinbaren Aktivitäten sind in Abb. 3.12 zusammen mit den Vertrauensintervallen für p=0,95 dargestellt. Für Lösung D als "Potentiator" ist die relative Aktivität erwartungsgemäß etwa gleich 1, für Captopril und Bradykinin Potentiator C in allen Konzentrationen dagegen signifikant (p<0,01) von 1 verschieden. Der Effekt von Captopril war in allen Konzentrationen für p<0,05 signifikant von Lösung D verschieden. Zwischen den verschiedenen Konzentrationen und Applikationsformen von Captopril ergaben sich keine

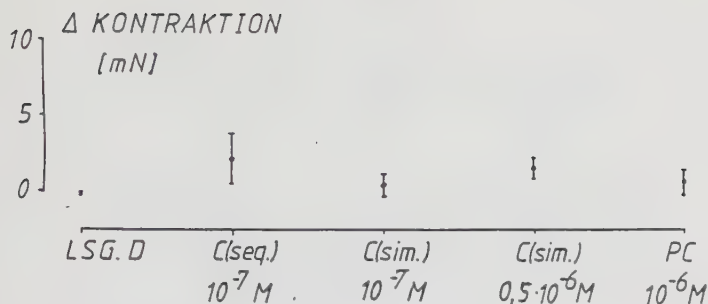


Abbildung 3.6

Effekt von Bradykinin Potentiator C (PC) und Captopril (C) auf die Kraftentwicklung des Meerschweinchenileums. Für Captopril ist sowohl der Effekt von Captopril (sim.) als auch der Effekt von Lösungsmittel 2 min nach Gabe von Captopril dargestellt (seq.). Lösung D allein (Lsg. D) diente als Kontrolle

signifikanten Unterschiede, insbesondere war die relative Aktivität bei simultaner Gabe von $10^{-7} M$ C mit 2,95 nur unwesentlich geringer als die bei Vorinkubation (3,34). Das bedeutet, daß bei simultaner Gabe von Bradykinin und Captopril eine ausreichende Hemmung der Kininase II erzielt werden kann.

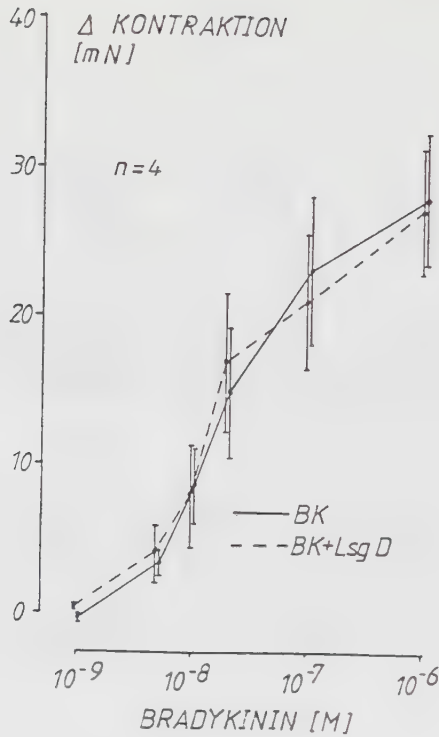


Abbildung 3.7

Durch Bradykinin am Meerschweinchenileum ausgelöste Kontraktionen mit und ohne Lösung D.

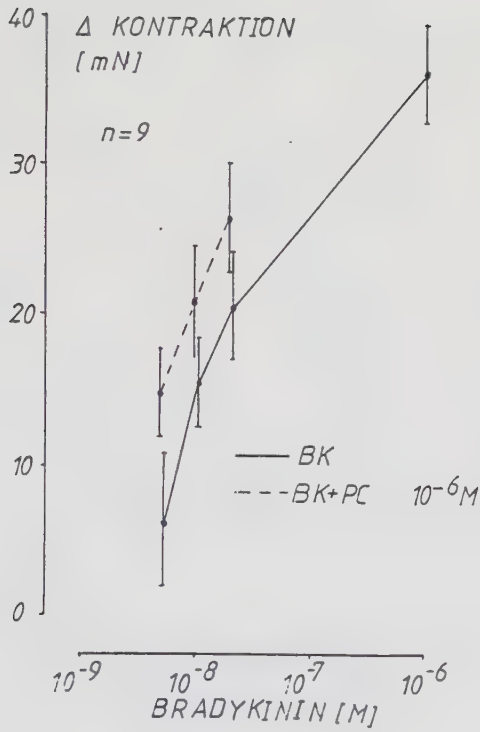


Abbildung 3.8

Durch Bradykinin am Meerschweinchenileum ausgelöste Kontraktionen mit und ohne Potentiator C

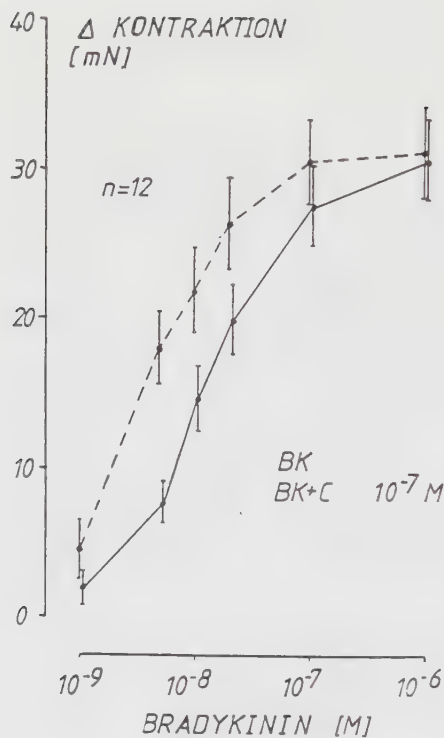


Abbildung 3.9

Durch Bradykinin am Meerschweinchenileum ausgelöste Kontraktionen mit und ohne simultane Gabe von Captopril 10^{-7} M

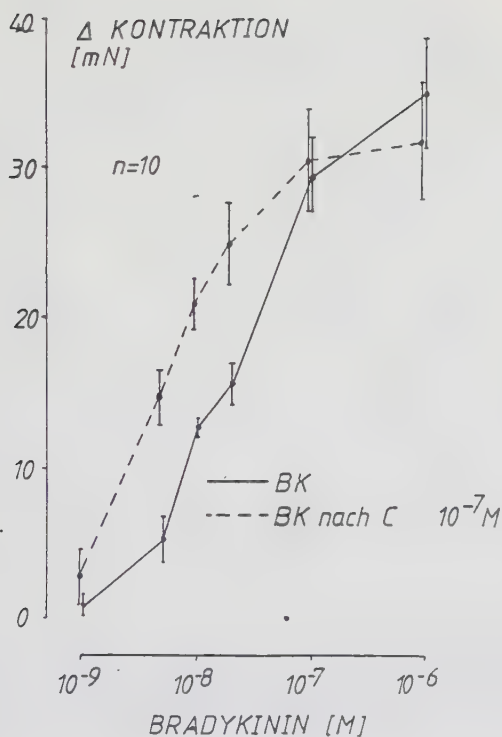


Abbildung 3.10

Durch Bradykinin am Meerschweinchenileum ausgelöste Kontraktionen mit und ohne 2 Minuten vorher erfolgter Gabe von Captopril $10^{-7}M$

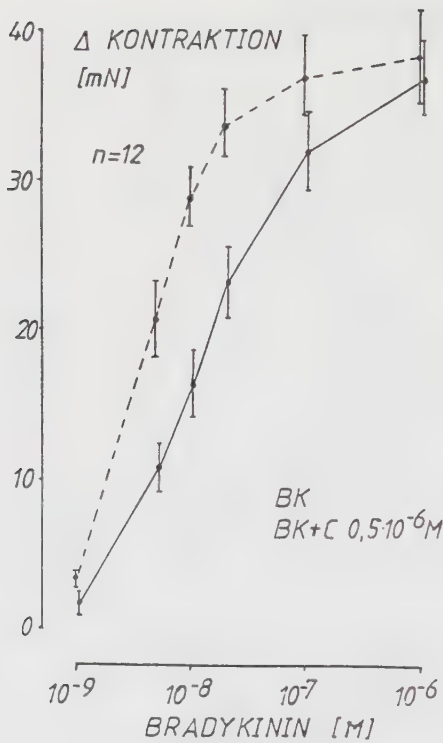


Abbildung 3.11

Durch Bradykinin am Meerschweinchenileum ausgelöste Kontraktionen mit und ohne simultane Gabe von Captopril $5 \cdot 10^{-7} M$

POTENZIERUNG DES BRADYKININEFFEKTS

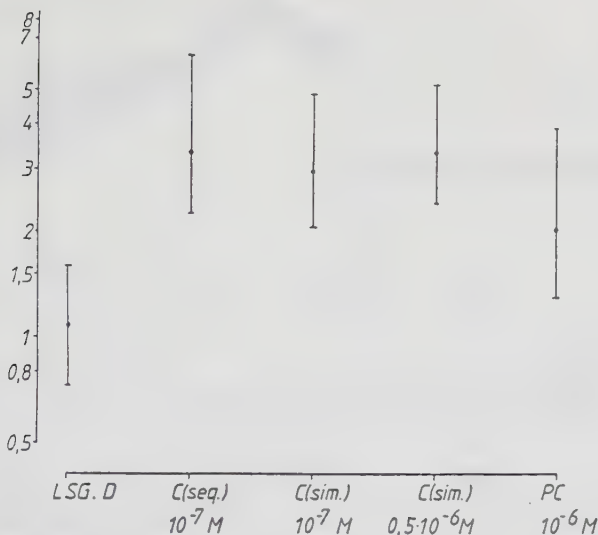


Abbildung 3.12

Vertrauensbereiche (95%) für den Bradykinin-potenzierenden Effekt von Lösung D (als Kontrolle), Captopril $10^{-7} M$ (simultan mit (sim) oder 2 Minuten vor (seq.) Bradykiningabe), Captopril $5 \cdot 10^{-7} M$ und Bradykinin Potentiator C $10^{-6} M$. Die Vertrauensbereiche wurden durch Aktivitätsabschätzungen auf der Basis paralleler Wirkgeraden im Konzentrationsbereich $0.5 \cdot 10^{-8}$ bis $2 \cdot 10^{-7} M$ gewonnen.

3.1.1.5. Der Effekt von Neurotensin am Meerschweinchenileum

Auf die Gabe von Neurotensin (NT, s. 2.3.2.5.) zeigte das Meerschweinchenileum zunächst eine kurzzeitige, relativ schwache Relaxation, der eine Kontraktion folgte. Ein typischer Kurvenverlauf ist in Abb. 3.13 dargestellt.

Die Dauer der Relaxation nahm im untersuchten Konzentrationsbereich mit zunehmender NT-Konzentration ab (Abb. 3.14, $p < 0,001$, $r_{av} = 0,96$, im Bereich $7,5 \cdot 10^{-9} M$ bis $6 \cdot 10^{-7} M$ NT). Die Relaxation war wie aus Abb. 3.15 hervorgeht, bei mittleren Konzentrationen am stärksten ($\max. 2,2 \pm 0,44 mN$), aus diesem Grund ergab sich ein zwar signifikanter, aber relativ geringer linearer Zusammenhang von Konzentration und Effekt ($p < 0,01$; $r_{av} = 0,29$).

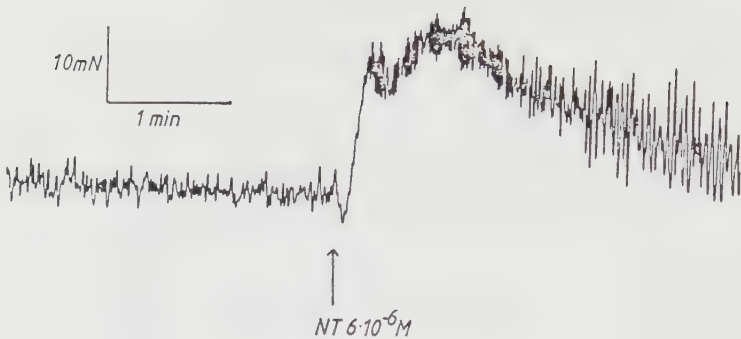


Abbildung 3.13

Effekt von Neurotensin (NT) auf die Kraftentwicklung des Meerschweinchenileums
(Originalregistrierung)

Die Kontraktionen (Abb. 3.16) nahmen mit steigender Konzentration deutlich zu ($p < 0,001$, $r_{av} = 0,92$), die maximale Kontraktion betrug $25,38 \pm 2,86$ mN ($n=3$), die Halbwirkkonzentration EC_{50} $1,1 \times 10^{-8}$ M ($pD_2 = 7,54$). Bei wiederholter Gabe fand sich bei Einhaltung des Erholungsintervalls kein Anhalt für Tachyphylaxie.

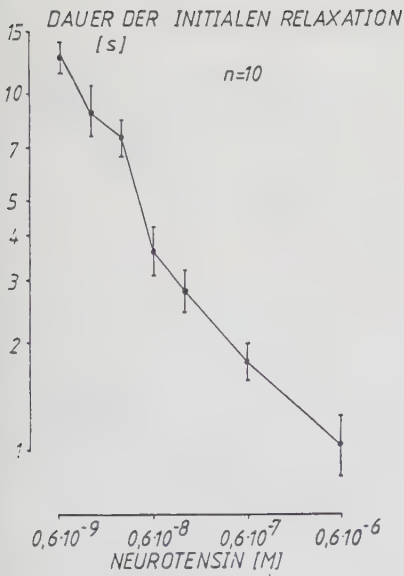


Abbildung 3.14
Dauer der initialen Relaxation
des Meerschweinchenileums nach
Neurotensinapplikation in Sekunden
(Mittelwert und SEM, basierend auf
logarithmierten Daten).

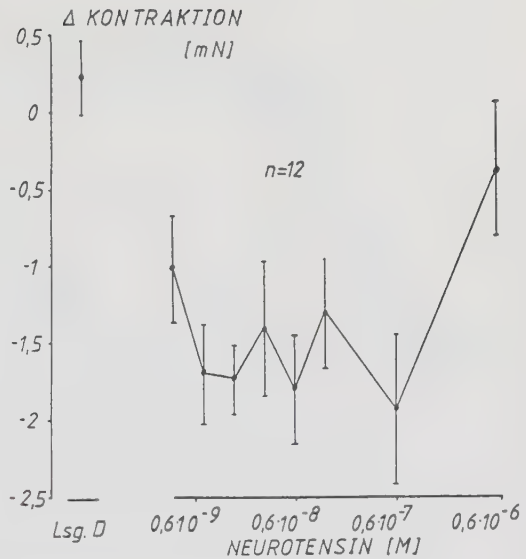


Abbildung 3.15
Stärke der durch Neurotensin
ausgelösten initialen Relaxation
in mN. Lösung D (Lsg D) als Kon-
trolle löst überhaupt keine Rela-
tion aus.

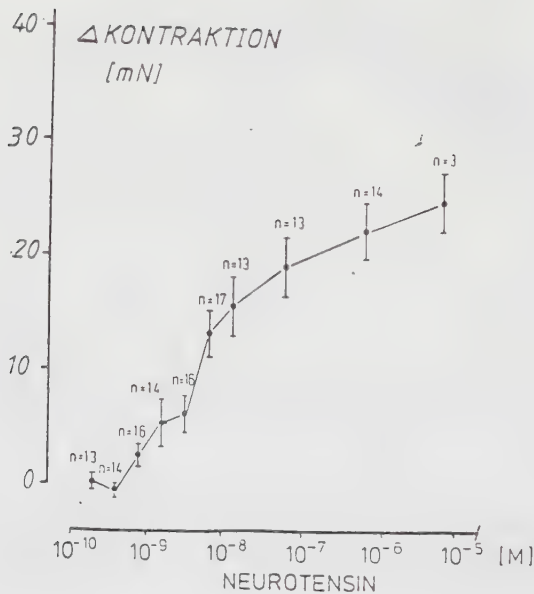


Abbildung 3.16

Kontraktion des Meerschweinchenileums nach Gabe von Neurotensin

3.1.1.6. Effekte von Noradrenalin und Carbachol am Meerschweinchenileum

Um Referenzwerte für die Reaktivität der Präparate zu erhalten, wurde parallel zu Neurotensin der Effekt von Carbachol und Noradrenalin auf das Meerschweinchenileum gemessen (2.3.2.5.). Carbachol $6 \times 10^{-6} \text{ M}$ löste starke Kontraktionen von $34,41 \pm 3,34 \text{ mN}$ ($n=14$) aus, eine typische Originalregistrierung ist in Abb. 3.17 dargestellt. Noradrenalin $6 \times 10^{-7} \text{ M}$ führte dagegen zu Relaxationen von $1,4 \pm 0,36 \text{ mN}$ ($n=8$); Abb. 3.18 zeigt dazu eine typische Registrierung.

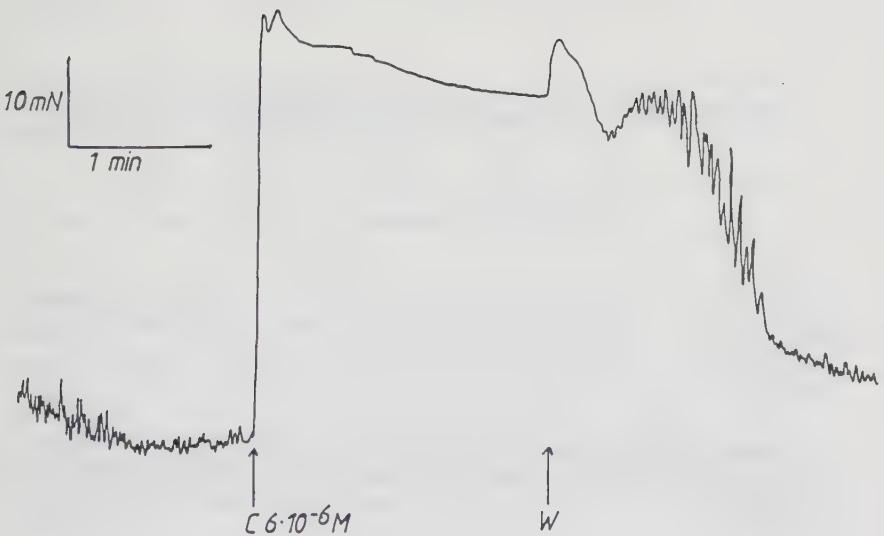


Abbildung 3.17
Kontraktion des Meerschweinchenileums nach Gabe von Carbachol (C)
(Originalregistrierung, nachgezeichnet)

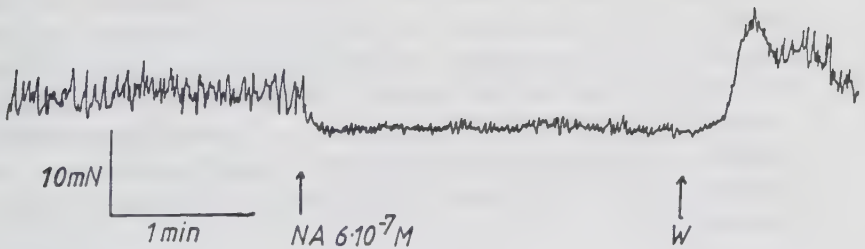


Abbildung 3.18
Relaxation des Meerschweinchenileums nach Gabe von Noradrenalin (NA)
(Originalregistrierung, nachgezeichnet)

3.1.2. Die Ergebnisse an den Pfortaderpräparationen

3.1.2.1. Die Spontanmotorik der Vena portae

Meerschweinchen- und Rattenpfortader zeigten sowohl in der Gesamtpräparation als auch in der Längsstreifenpräparation spontane Kontraktionen. Frequenz und Stärke der Kontraktionen

sind in Tabelle 3.4 zusammengestellt.

Tabelle 3.4

Spontanmotorik der Pfortaderpräparationen

Präparation	n	Frequenz (min^{-1})			Stärke (mN)	
		Median	Minimum	Maximum	Mittel	SEM
MP	12	0,8	0,36	2,36	8,44	0,75
MP-LS	7	1,06	0,41	3,46	3,93	0,56
RP	2	2,22	1,71	2,72	4,06	0,25
RP-LS	12	2,45	1,88	4,1	3,28	0,35

Angegeben sind minimale, maximale und mediane Frequenz sowie Kontraktionsstärke (Mittelwert und SEM) von Meerschweinchenpfortader in Gesamt- (MP) und Längsstreifenpräparation (MP-LS) und Rattenpfortader in Gesamt- (RP) und Längsstreifenpräparation (RP-LS)

Die statistische Auswertung mit Varianzanalyse und Scheffé-Test zeigte, daß die Kraft der Spontankontraktionen der Gesamtpfortader des Meerschweinchens signifikant größer als die der Längsstreifenpräparationen von Meerschweinchen und Ratte waren. Die Frequenz war bei der Längsstreifenpräparation der Rattenpfortader signifikant höher als bei den Meerschweinchenpräparationen. Die Gesamtpräparation der Rattenpfortader wurde in die statistische Analyse wegen der geringen Versuchszahl nicht einbezogen.

3.1.2.2 Der Lösungsmittleffekt an der Vena portae

Die Applikation von Lösung D alleine führte an der Gesamtpräparation der Meerschweinchenpfortader und den Längsstreifenpräparationen der Pfortadern von Meerschweinchen und Ratte nur zu minimalen, nicht signifikanten Änderungen von Frequenz, Basaltonus oder Stärke der Kontraktionen (s. Tabelle 3.5)

Tabelle 3.5

Der Effekt von Lösung D auf Frequenz, Basaltonus und Stärke der phasischen Kontraktionen von Meerschweinchenpfortader (MP) und Längsstreifen von Meerschweinchenpfortader (MP-LS) und Rattenpfortader (RP-LS)

	Präparation		
	MP	MP-LS	RP-LS
Frequenzverhältnis	$1,13 \pm 0,07$	$1,11 \pm 0,10$	$1,04 \pm 0,04$
Basaltonus (mN)	$0,20 \pm 0,17$	$0,02 \pm 0,03$	$-0,04 \pm 0,05$
phas. Kontraktion (mN)	$-0,03 \pm 0,49$	$-0,03 \pm 0,15$	$-0,04 \pm 0,10$

Die angegebenen Werte sind Mittelwert $\pm$ SEM und entsprechen für Basaltonus und phasische Kontraktionen der Differenz zu den Werten vor Gabe von Lösung D, für die Frequenz den Quotienten aus dem Wert nach und vor Lösung D.

3.1.2.3 Der Effekt von Neurotensin auf die Meerschweinchenpfortader

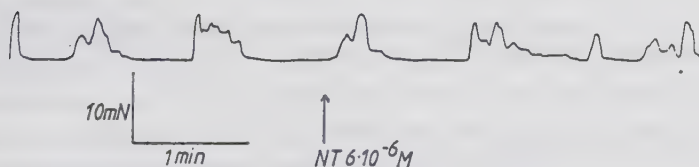


Abbildung 3.19
Einfluß von Neurotensin (NT) auf die Spontanmotorik der Meerschweinchenpfortader (Originalregistrierung, nachgezeichnet)

Abb. 3.19 zeigt, daß $6 \times 10^{-6} \text{M}$ Neurotensin keinen Einfluß auf die Spontanmotorik der Gesamtpräparation der Meerschweinchenpfortader hat. Zur quantitativen Auswertung wurden die Änderung der Frequenz der Kontraktionen (Abb. 3.20), des Basaltonus (Abb. 3.21) und der Stärke der maximalen phasischen Kontraktionen (Abb. 3.22) nach Neurotensinapplikation ($1,8 \times 10^{-10}$ bis $6 \times 10^{-6} \text{M}$) untersucht. In den angeführten Abbildungen werden jeweils die Gesamtpräparation der Meerschweinchenpfortader, und die Längs-

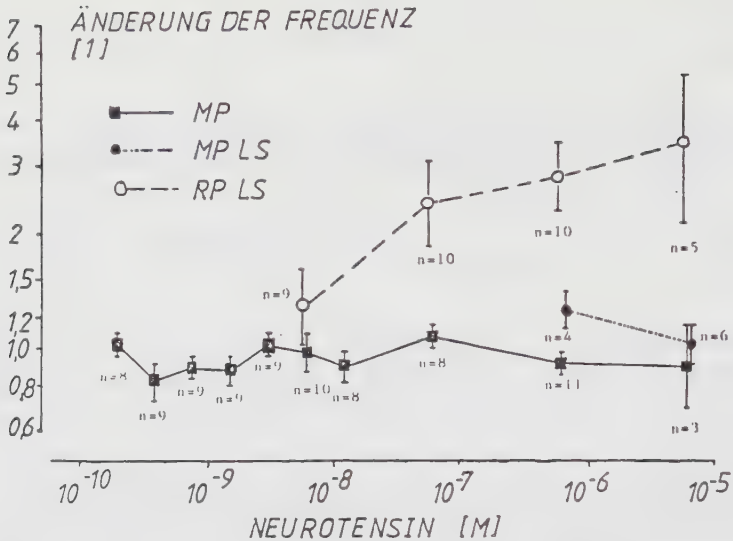


Abbildung 3.20

Änderung der Frequenz von Meerschweinchenpfortader (MP), deren Längsstreifen (MP-LS) und Rattenpfortaderlängsstreifen (RP-LS) nach Neurotensinapplikation (Mittelwerte und SEM der logarithmisierten Daten)

streifenpräparationen der Pfortader von Ratte und Meerschweinchen miteinander verglichen. Man erkennt, daß Neurotensin im untersuchten Konzentrationsbereich an den Meerschweinchenpfortaderpräparationen ohne relevanten Einfluß auf die Frequenz der Kontraktionen, den Basaltonus oder die Stärke der phasischen Kontraktionen ist. Um auszuschließen, daß durch die vorangehenden niedrigen NT-Konzentrationen eine Desensitisierung der MP auftrat, wurden zusätzlich zu den Versuchen mit vollständiger Dosis-Wirkungs-Kurve von $1,8 \times 10^{-10} \text{ M}$ bis $6 \times 10^{-7} \text{ M}$ an einigen Venen nur die höchsten Konzentrationen gemessen. Entsprechend erfolgte die statistische Auswertung getrennt für die Konzentrationsbereiche 10^{-10} M bis $6 \times 10^{-7} \text{ M}$ und $6 \times 10^{-7} \text{ M}$ bis $6 \times 10^{-6} \text{ M}$ (s. Tab 3.6), in keinem der beiden Bereiche gab es einen statistisch signifikanten Trend. An der Längsstreifenpräparation der Meerschweinchenpfortader wurden von vorneherein nur die hohen Konzentrationen gemessen. Auch hier hatte Neurotensin keinen signifikanten Einfluß (s. Tab. 3.6).

In einzelnen Versuchen wurde Neurotensin an eine mit Noradrena-

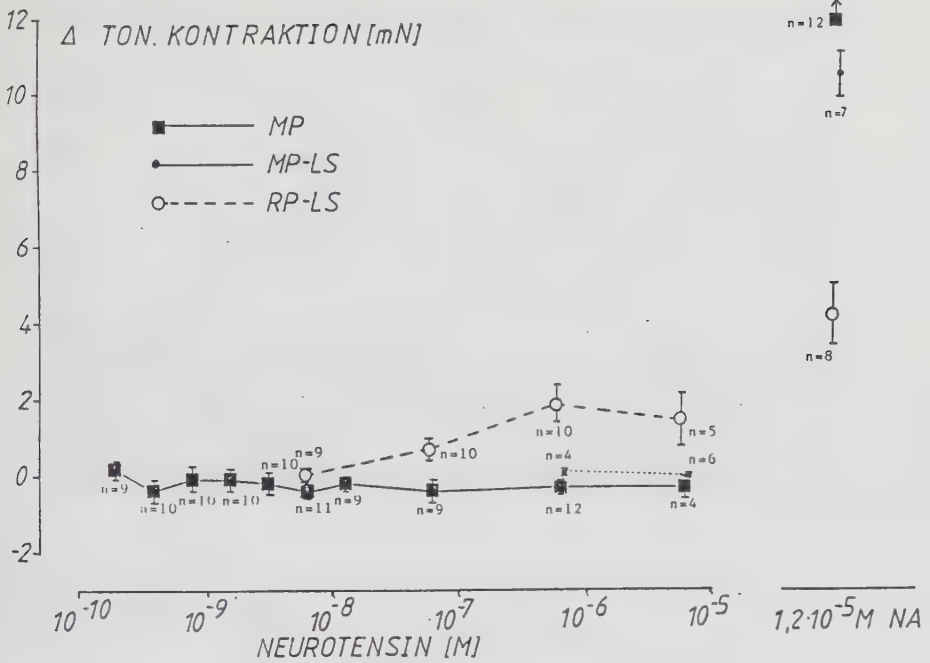


Abbildung 3.21

Änderung des Basaltonus von Meerschweinchenpfortader (MP), deren Längsstreifen (MP-LS) und Rattenpfortaderlängsstreifen (RP-LS) nach Neurotensinapplikation

lin vorkontrahierte Meerschweinchenpfortader gegeben, ohne daß ein Effekt beobachtet wurde (Abb. 3.23).

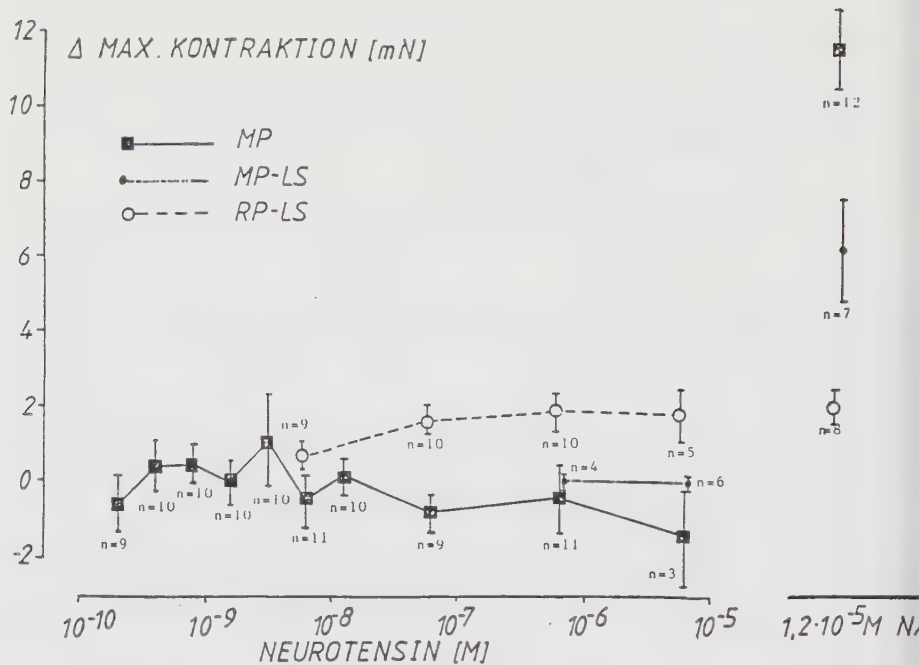


Abbildung 3.22

Änderung der maximalen phasischen Kontraktionskraft von Meerschweinchenpfortader (MP), deren Längsstreifen (MP-LS) und Rattenpfortaderlängsstreifen (RP-LS) nach Neurotensinapplikation

Tabelle 3.6

Statistische Auswertung des Neurotensineffekts an den verschiedenen Pfortaderpräparationen

Präparation	Konzentrationen	Frequenz		Basalspannung		phas. Kontrakt.	
		n	p	r_{av}	p	r_{av}	p
MP	7×10^{-10} - 6×10^{-7} M	9	n.s.	0,05	n.s.	-0,09	n.s.
	6×10^{-7} - 6×10^{-6} M	4	n.s.	-0,13	n.s.	0	n.s.
MP-LS	6×10^{-7} - 6×10^{-6} M	3	n.s.	0,33	n.s.	0,33	n.s.
RP-LS	6×10^{-9} - 6×10^{-7} M	9	0,01	0,57	0,001	0,67	0,001

phas. Kontrakt. = phasische Kontraktionen

Da an der Meerschweinchenpfortader (MP) in einem Teil der Fälle Dosiswirkungskurven von 7×10^{-10} M bis 6×10^{-7} M und in einem anderen Teil nur die höchsten Konzentrationen 6×10^{-7} M und 6×10^{-6} M gemessen wurde, erfolgte die statistische Auswertung getrennt für beide Bereiche. Wegen der geringen Zahl der Werte mit 6×10^{-7} M und 6×10^{-6} M an Meerschweinchenpfortaderlängsstreifen (MP-LS) wurde hier zusätzlich 6×10^{-6} M mittels des Wilcoxon-Tests für Paardifferenzen (n=6) mit dem Lösungsmittelleffekt verglichen, ohne daß sich hierbei signifikante Unterschiede ergaben. RP-LS bedeutet Rattenpfortaderlängsstreifen.

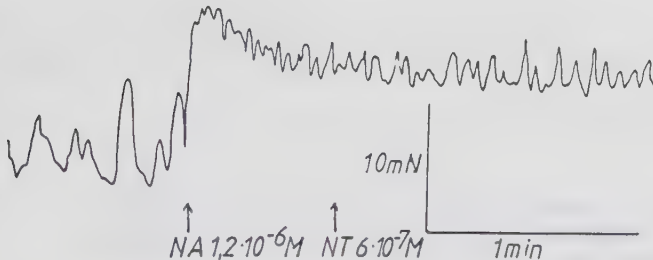


Abbildung 3.23

Effekt von Neurotensin (NT) an einer mit Noradrenalin (NA) vorkontrahierten Meerschweinchenpfortader (Originalregistrierung, nachgezeichnet)

3.1.2.4. Der Effekt von Neurotensin am Längsstreifen der Rattenpfortader

Die Applikation von Neurotensin im Konzentrationsbereich $6 \times 10^{-9} \text{ M}$ bis $6 \times 10^{-6} \text{ M}$ führte zu deutlichen Kontraktionen. Für die Frequenz (Abb. 3.20) zeigte sich dabei ein signifikanter Anstieg ($p < 0,01$, $r_{\text{av}} = 0,57$) um den Faktor $4,7 \pm 1,3$. Der Basaltonus (Abb. 3.21) nahm signifikant ($p < 0,001$; $r_{\text{av}} = 0,67$) um bis zu $1,64 \pm 0,42 \text{ mN}$ zu, die Stärke der maximalen phasischen Kontraktionen (Abb. 3.22) stieg signifikant ($p < 0,001$; $r_{\text{av}} = 0,96$) um bis zu $2,12 \pm 0,27 \text{ mN}$. Die Halbwirkkonzentration EC_{50} betrug für die Frequenz $1,3 \times 10^{-7} \text{ M}$ ($\text{pD}_2 = 6,9$), für den Basaltonus $1,1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ($\text{pD}_2 = 7,0$) und für die Spitzenkraft $3,8 \times 10^{-8} \text{ M}$ ($\text{pD}_2 = 7,4$). Bei mehrfacher Gabe der selben Konzentration waren die erhaltenen Effekte etwa konstant.

3.1.2.5. Der Effekt von Carbachol, Noradrenalin und Bradykinin an der Pfortader

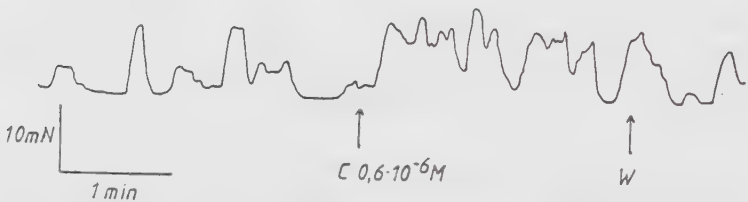


Abbildung 3.24a
Effekt von Carbachol (C) auf die Spontanmotorik der Meerschweinchenpfortader
(Originalregistrierung, nachgezeichnet)

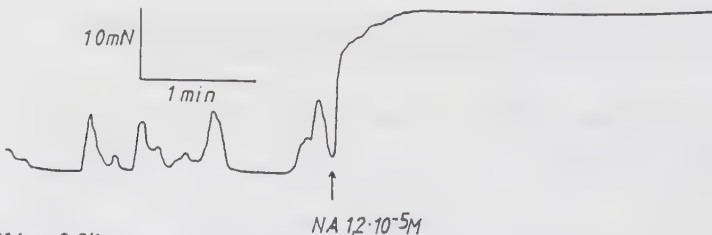


Abbildung 3.24b
Effekt von Noradrenalin (NA) auf die Spontanmotorik der Meerschweinchenpfortader (Originalregistrierung, nachgezeichnet)

Carbachol ($6 \times 10^{-6} \text{ M}$) und Noradrenalin in den Konzentrationen von $6 \times 10^{-7} \text{ M}$ und $1,2 \times 10^{-5} \text{ M}$ führten zu ausgeprägten Kontraktionen an den untersuchten Pfortaderpräparationen von Ratte und Meerschweinchen (Abb. 3.24) mit Anstiegen von Basaltonus und maximaler Kontraktionskraft (s. Tab. 3.7). Noradrenalin $1,2 \times 10^{-5} \text{ M}$ an allen Präparationen und Carbachol ($6 \times 10^{-6} \text{ M}$) am Längsstreifen der Rattenpfortader löste rein tonische Kontraktionen aus, Noradrenalin $6 \times 10^{-7} \text{ M}$ an allen Präparationen und Carbachol ($6 \times 10^{-6} \text{ M}$) an den Meerschweinchenpräparationen führte dagegen zu deutlichen Anstiegen der Frequenz. Die Reaktivität der Meerschweinchenpfortader, die keinen Effekt auf Neurotensin zeigte, wurde außer mit der kontraktionserzeugenden Wirkung von Carbachol und Noradrenalin in Einzelversuchen noch mit Bradykinin geprüft, das ebenfalls Kontraktionen auslöst, wie Abb. 3.25 zeigt.

Tabelle 3.7

Effekt von Carbachol (C) und Noradrenalin (NA) an Meerschweinchenpfortader (MP) und Längsstreifen der Pfortader von Meerschweinchen (MP-LS) und Ratte (RP-LS)

Präparat	Meßparameter	C $6 \times 10^{-6} \text{ M}$	NA $6 \times 10^{-7} \text{ M}$	NA $1,2 \times 10^{-5} \text{ M}$
MP	Frequenz	$4,96 \pm 0,85$	---	---
	Basalspannung (mN)	$5,56 \pm 1,02$	$13,12 \pm 2,47$	$20,82 \pm 1,32$
	phas. Kontr. (mN)	$2,48 \pm 0,46$	$5,98 \pm 1,48$	$11,49 \pm 0,71$
MP-LS	Frequenz	$4,25 \pm 0,85$	---	---
	Basalspannung (mN)	$0,82 \pm 0,17$	$7,56 \pm 0,83$	$10,52 \pm 0,57$
	phas. Kontr. (mN)	$1,50 \pm 0,37$	$4,02 \pm 0,59$	$7,38 \pm 0,91$
RP-LS	Frequenz	---	$7,08 \pm 1,06$	---
	Basalspannung (mN)	$4,75 \pm 0,43$	$4,16 \pm 0,39$	$4,22 \pm 1,09$
	phas. Kontr. (mN)	$2,13 \pm 0,21$	$2,59 \pm 0,25$	$1,76 \pm 1,07$

phas. Kontr. = phasische Kontraktionen

Alle Werte sind Mittel $\pm$ SEM

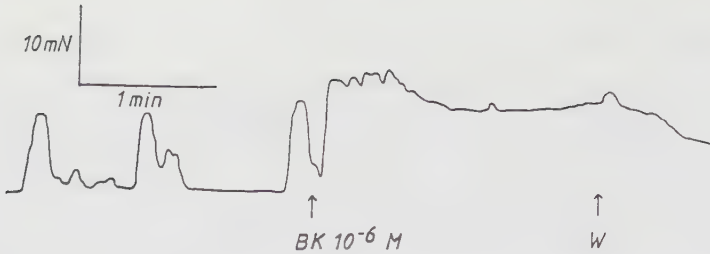


Abbildung 3.25
Effekt von Bradykinin (BK) auf die Spontannotorik der Meerschweinchenpfortader
(Originalregistrierung, nachgezeichnet)

Die Ergebnisse *in vitro* sind in Tabelle 3.8 nochmals synoptisch zusammengefaßt.

Tabelle 3.8

Synopsis der Effekte von Bradykinin (BK), Neurotensin (NT), Carbachol (C) und Noradrenalin (NA) auf die Basalspannung der *in-vitro*-Präparationen Meerschweinchenileum (MI), Meerschweinchenpfortader (MP) und Längsstreifen der Pfortader von Meerschweinchen (MP-LS) und Ratte (RP-LS). Es ist jeweils Mittelwert $\pm$ SEM angegeben

	MI	MP	MP-LS	RP-LS
Lsg. D	$0,75 \pm 0,16$ (n=84)	$0,20 \pm 0,17$ (n=14)	$0,02 \pm 0,03$ (n=12)	$-0,04 \pm 0,05$ (n=13)
10^{-6} M BK	$35,84 \pm 1,90$ (n=25)	—	—	—
6×10^{-6} M NT	$25,38 \pm 2,86$ (n= 3)	$0,03 \pm 0,06$ (n= 4)	$0,01 \pm 0,04$ (n= 7)	$1,44 \pm 0,68$ (n= 5)
6×10^{-6} M C	$34,41 \pm 3,34$ (n=14)	$5,56 \pm 1,02$ (n=11)	$0,82 \pm 0,17$ (n= 7)	$4,75 \pm 0,43$ (n=11)
6×10^{-7} M NA	$-1,40 \pm 0,36$ (n= 8)	$13,12 \pm 2,47$ (n= 4)	$7,56 \pm 0,83$ (n= 7)	$4,16 \pm 0,39$ (n=11)

3.2. Ergebnisse an den Piaarteriolen *in situ*

3.2.1. Der Lösungsmittelleffekt an den Piaarteriolen

Während der perivaskulären Mikroapplikation von Lösung D alleine kam es nur zu minimalen, nicht signifikanten Änderungen des Gefäßdurchmessers, die in den einzelnen Serien zwischen einer mittleren Dilatation von $0,478 \pm 0,421$ % und einer mittleren Kontraktion von $0,16 \pm 0,36$ % maximal variierte.

3.2.2. Der Effekt von Bradykinin

Es wurden extraparenchymale Arterien und Arteriolen mit einem

Kontrolldurchmesser von 80 - 260 μm untersucht. Die perivaskuläre Mikroapplikation von Bradykinin führte zu einer sofort einsetzenden Erweiterung des Gefäßes, die 20 bis 40 s nach Injektionsbeginn konstant war und sich 1 - 5 min nach Injektionsende vollständig zurückgebildet hatte. Das Ausmaß der Dilatation war deutlich dosisabhängig (Abb. 3.26), bei 10^{-5}M ergab sich die maximale Dilatation von 45,5%. Die Halbwirksamkeit EC_{50} war $4,4 \times 10^{-7}\text{M}$, der entsprechende pD_2 betrug 6,36.

Um einen Zusammenhang von Gefäßdurchmesser und Reaktivität

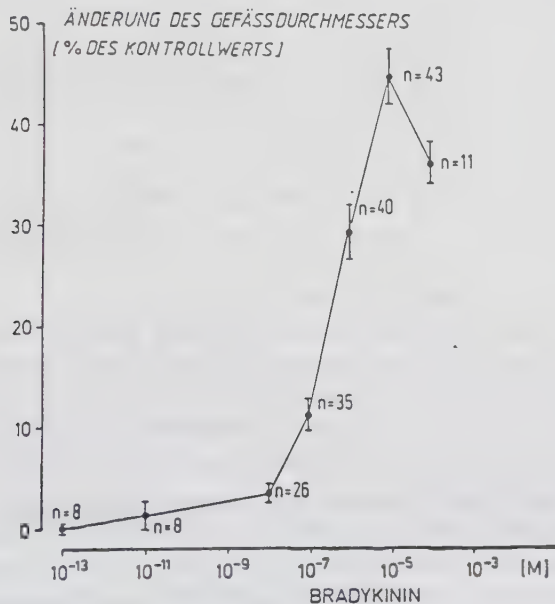


Abbildung 3.26

Änderung des Durchmessers (in Prozent des Ausgangsdurchmessers) von Piaarterien der Katze nach Mikroapplikation von Bradykinin

festzustellen, wurden für die drei Konzentrationen 10^{-5}M , 10^{-6}M und 10^{-7}M lineare Regressionen für die Beziehung zwischen der prozentualen Änderung des Durchmessers und den Ausgangsdurchmesser berechnet (Abb. 3.27); die erhaltenen Korrelationskoeffizienten waren jedoch nur gering und in keinem Fall signifikant von 0 verschieden (10^{-5}M : $r=-0,276$; 10^{-6}M : $r=-0,259$; 10^{-7}M : $r=-0,164$).

Bei fünfmaliger Gabe der selben Konzentration von Bradykinin und jeweiliger Rückkehr des Gefäßdurchmessers nach Applikationsende zum Kontrollwert ließen sich keine signifikanten Unterschiede der Effekte auf Bradykinin und somit keine Hinweise auf Tachyphylaxie finden.

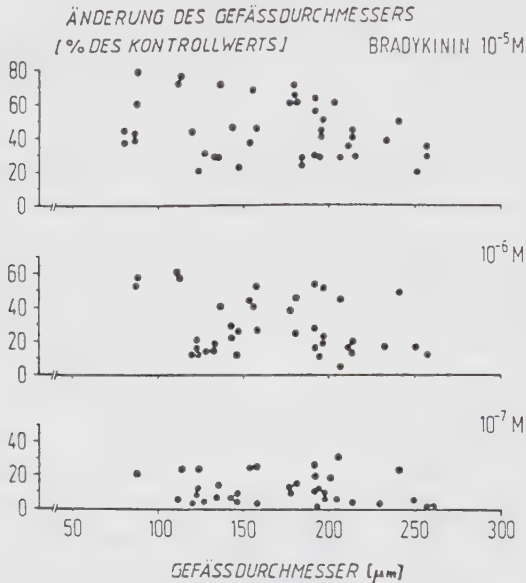


Abbildung 3.27

Beziehung zwischen prozentualer Änderung des Gefäßdurchmessers nach Bradykininapplikation und Ausgangsdurchmesser

3.2.3. Der Effekt von Hemmstoffen der Kininase II

Wie in Abb. 3.28 gezeigt ist, führt Captopril (10^{-10} - 10^{-3} M) zu minimalen Dilatationen, die zwischen 0,53% und 3,2% des Kontrolldurchmessers betragen. Der Effekt von Bradykinin Potentiator C (10^{-10} - 10^{-4} M) lag zwischen einer minimalen Konstriktion von 1,02 % und einer minimalen Dilatation von 0,97% des Kontrolldurchmessers. Statistisch (Varianzanalyse) waren die Eigeneffekte beider Kininase II Inhibitoren nicht vom Lösungsmittelleffekt unterschieden.

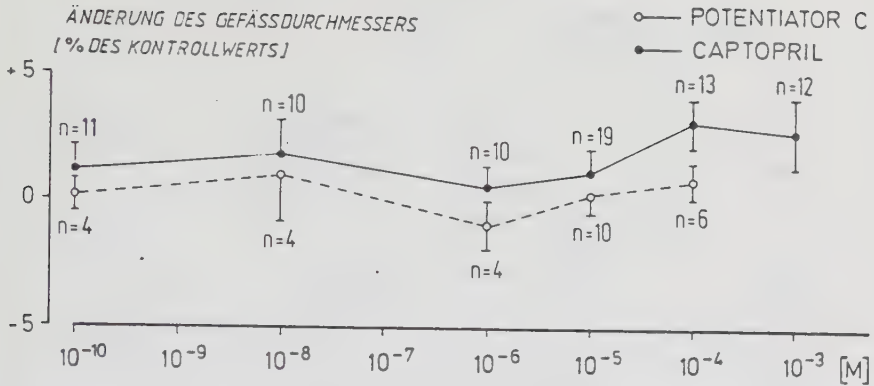


Abbildung 3.28

Änderung des Durchmessers von Piaarterien der Katze in Prozent des Ausgangsdurchmessers nach Mikroapplikation von Bradykinin Potentiator C (PC) oder Captopril (C)

3.2.4. Der Einfluß von Hemmstoffen der Kininase II auf die Bradykinin-Dosis-Wirkungs-Kurve

Die simultane Gabe von Bradykinin Potentiator C 10^{-5} M mit Bradykinin führte zu einer Dosis-Wirkungs-Kurve, die sich nicht von der zuvor mit Bradykinin allein am selben Gefäß gewonnenen unterschied (Abb. 3.29). Auch für Captopril 10^{-5} M gab es keinen Unterschied zwischen den ohne und mit Hemmstoff an den selben Gefäßen gewonnen Dosis-Wirkungs-Kurven (Abb. 3.30). Die statistische Auswertung mit dem Scheffé-Test ergab bei keiner Konzentration einen signifikanten Unterschied von Bradykinin allein oder Bradykinin mit Kininase II Inhibitor. Im Konzentrationsbereich von 10^{-7} M bis 10^{-5} M erbrachte ein Aktivitätsvergleich mittels paralleler Wirkgeraden für Bradykinin und Potentiator C eine relative Aktivität von 0,93 (95%-Vertrauensbereich von 0,25 bis 3,41; wegen signifikanter Abweichungen von der Linearität ist das Vertrauensintervall allerdings nur eingeschränkt verwertbar) gegenüber Bradykinin alleine, für Bradykinin und Captopril eine solche von 0,76 (95%-Vertrauensbereich 0,27 bis 2,09).

ÄNDERUNG DES GEFÄSSDURCHMESSERS
[% DES KONTROLLWERTS]

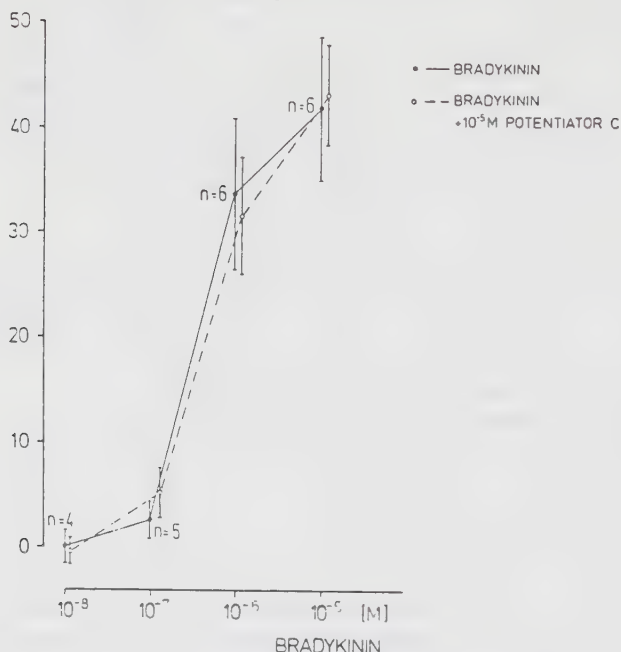


Abbildung 3.29

Prozentuale Änderung des Durchmessers von Piaarterien nach Bradykiningabe ohne oder mit gleichzeitiger Mikroapplikation von Bradykinin Potentiator C

3.2.5. Der Effekt von Neurotensin

Der Effekt von Neurotensin wurde an Piaarterien mit einem Durchmesser von 60 - 233 μ m untersucht. Wie Abb. 3.31 zeigt, kam es im Konzentrationsbereich von 6×10^{-12} M bis 6×10^{-5} M bei der Gabe ansteigender oder einzelner Konzentrationen von Neurotensin zu keiner signifikanten Änderung des Gefäßdurchmessers ($p < 0,05$, $r_{av} = -0,035$).

ÄNDERUNG DES GEFÄSSDURCHMESSERS
[% DES KONTROLLWERTS]

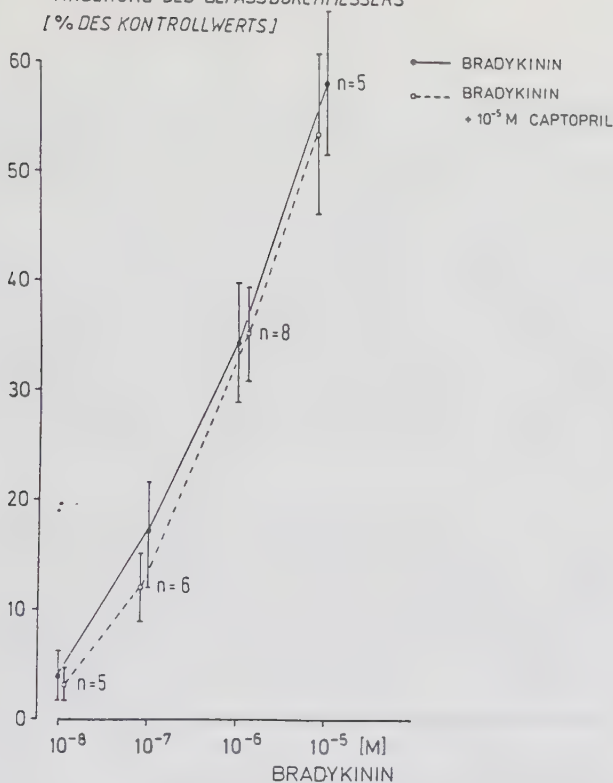


Abbildung 3.30

Prozentuale Änderung des Durchmessers von Piaarterien nach Bradykiningabe ohne oder mit gleichzeitiger Mikroapplikation von Captopril

ÄNDERUNG DES GEFÄSSDURCHMESSERS
[% DES KONTROLLWERTS]

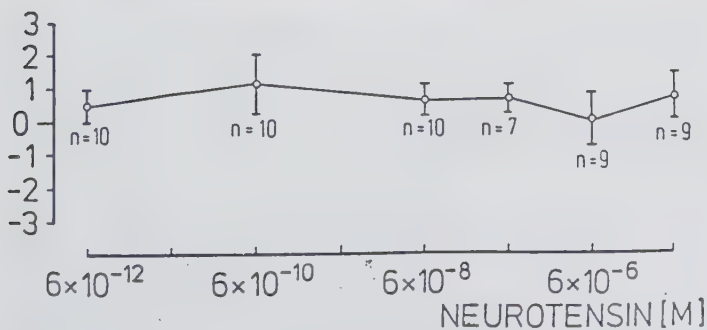


Abbildung 3.31

Änderung des Durchmessers von Piaarterien in Prozent des Ausgangsdurchmessers nach Mikroapplikation von Neurotensin

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Methodik

4.1.1. Diskussion der Methodik in vitro

Die Messung der Kontraktion glattmuskulärer Organe in vitro ist eine lang eingeführte und weit verbreitete Technik, die oftmals für Rezeptoruntersuchungen (147) oder als Bioassay bei der Charakterisierung einer neu gefundenen Substanz z.B. Neurotensin (41) benutzt wird. Um eine korrekte Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen, wird im folgenden zunächst untersucht, inwieweit die Grundvoraussetzungen für eine Messung gegeben waren, welche möglichen Fehlerquellen existieren und inwieweit eine direkte Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen anderer Autoren gegeben ist. Außerdem wird kurz auf die statistische Auswertung und ihre Aussagekraft eingegangen.

4.1.1.1. Grundvoraussetzungen für eine Messung

Grundvoraussetzungen für eine sinnvolle Messung sind Stabilität und Einheitlichkeit der Präparate (147).

Die Stabilität der Spontanmotorik wurde durch eine Reihe von Maßnahmen sichergestellt:

Nach Einhängen der Präparate wurde mindestens eine Stunde bis zum Beginn der Messungen gewartet. War bis zu diesem Zeitpunkt noch keine weitgehend konstante Spontanmotorik erreicht, wurde mit dem Beginn der Messungen weiter gewartet. Die durch die Substanzen ausgelösten Effekte waren voll reversibel. Nach Abschluß jeder Einzelmessung wurde die Substanz herausgespült; der Abstand der Messungen war so gewählt, daß die Spontanmotorik vor jeder weiteren Messung wieder weitgehend der anfänglichen Spontanmotorik entsprach. Kam es während der Meßreihe zu stärkeren Schwankungen der Spontanmotorik, insbesondere des basalen Tonus, wurde die Messung abgebrochen.

In Vorversuchen zeigte sich eine weitgehende Konstanz der Reaktionen auf dieselbe Konzentration derselben Substanz am selben Präparat. Das bestätigt auch eine nachträgliche Analyse: Ein Maß für die Konstanz der Antwort ist der Variationskoeffizient $V = s/\bar{x}$. Beim Vergleich verschiedener Bradykininchargen wurde jede Konzentration dreimal am selben Darm gemessen, die Variationskoeffizienten betrugen im Median 0,13 (0,02 - 0,36), wobei die höheren Variationskoeffizienten vorwiegend bei den niedrigsten Konzentrationen auftraten, bei denen der nur sehr geringe Effekt im "Rauschen" der spontanen Basaltonusschwankungen unterging. Wurden diese weggelassen, war der Median 0,08.

Shimuta et al. (261) berichten, daß die Sensitivität des isolierten Meerschweinchenileums während 3 - 4 h unter 1 g Dehnung selektiv für Bradykinin um ca. den Faktor 2 zunahm, während sie bei gleich langer Inkubation ohne Vordehnung konstant blieb. Parallel zur Linksverschiebung der Bradykinin-Dosis-Wirkungskurve nahm der potenzierende Effekt der Bradykinin-Potentiatoren BPP_{9a} und B aber nicht der von Potentiator C in dieser Arbeit ab. Wäre dieser Effekt auch in der vorliegenden Untersuchung aufgetreten, dann hätte das bei den Experimenten mit Vergleich von Bradykinin "frisch" mit "5 h alt" dazu geführt, daß deutliche Unterschiede in der Dosis-Wirkungs-Kurve in Abhängigkeit davon bestünden, ob das gegebene Bradykinin sofort oder erst nach dem Vergleichsbradykinin am Darm gemessen wurde. Bei den Untersuchungen mit Kininase-II-Hemmern, bei denen immer zunächst Bradykinin allein und anschließend Bradykinin mit Kininase-II-Hemmer gemessen wurde und zwischen dem Beginn beider Meßreihen ein Abstand von 1 1/2 bis 2 h lag, würde eine Sensitivitätszunahme eine verstärkte Potenzierung vortäuschen. Es wurde deshalb in einigen Versuchen anstelle des in Lösung D gelösten Kininase-II-Hemmers nur Lösung D zu den Bradykininlösungen gegeben; es zeigte sich, daß ohne Zugabe eines Kininase-II-Hemmers die erste und zweite Dosis-Wirkungs-Kurve praktisch nicht unterschieden waren (Abb. 3.6). Auch beim Vergleich "Bradykinin frisch" mit "Bradykinin 5 h alt" gab es keine Unterschiede in Abhängigkeit davon, ob das "Bradykinin frisch" zuerst oder erst im Anschluß an "Bradykinin 5 h alt" gemessen

wurde (Abb. 3.2a). Auch wenn angesichts der geringen Versuchszahl eine vorhandene kleine Verschiebung statistisch wohl nicht erfaßt worden wäre, spricht die sehr gute Übereinstimmung der Kurven deutlich gegen eine Sensitivitätszunahme bezüglich Bradykinin. Da in den vorliegenden Untersuchungen die Messungen immer erst nach mindestens 1 h begonnen wurden und die Vorspannung mit 18 mN etwa doppelt so hoch war wie bei Shimuta, ist es auch möglich, daß die Sensitivitätszunahme bis zum Beginn der ersten Messung schon abgeschlossen war.

Beim Vergleich "Bradykinin frisch" mit "Bradykinin 5 h alt" gab es keine relevanten Unterschiede der mittleren Effekte zwischen "Bradykinin frisch" und "Bradykinin 5 h alt" und keine Abhängigkeit von der Applikationsreihenfolge. Damit wurde an jedem Darm jede Konzentration zweimal gemessen und es läßt sich daraus ein Variationskoeffizient berechnen. Beachtet man nun, daß bei der Applikation von zunächst "Bradykinin 5 h alt", dann "Bradykinin frisch" zwei verschiedene Bradykinin-Lösungen eingesetzt werden mußten, während bei der umgekehrten Reihenfolge zweimal dieselbe Lösung benutzt wurde, würden große Schwankungen von Lösung zu Lösung dazu führen, daß die Variationskoeffizienten bei Messung von zunächst "Bradykinin 5 h alt" im Mittel wesentlich größer sind als die bei der Messung von zunächst "Bradykinin frisch". Wie in Tabelle 4.1. dargestellt, ist dies jedoch nur in einem sehr geringen Ausmaß der Fall, so daß die Lösungen offensichtlich relativ konstant hergestellt wurden.

Die Variation zwischen Meßwerten, die an verschiedenen Präparaten gewonnen wurden, war dagegen deutlich größer (Tabelle 4.2.). Aus diesem Grund wurden zur statistischen Auswertung Verfahren benutzt, die die kleine Variation innerhalb eines Darmes ausnützen können.

In Tabelle 4.3. sind die Faktoren zusammengestellt, die die Eigenschaften glattmuskulärer Organe beeinflussen können (kombiniert aus 14, 147). Die Ursachen für die Variabilität von Darm zu Darm sind hauptsächlich in Punkt 1 und dem in Punkt 2 angesprochenen, variablen Präparationsgeschick zu suchen. So wurden die Tiere zwar von einem Händler bezogen, gehörten aber

Tabelle 4.1

Variationskoeffizienten an einem Darm für Bradykinin (BK)

Konzentr.	zuerst "frisch"			zuerst "5 h alt"		
	Mittel	SEM	Median	Mittel	SEM	Median
BK 10^{-9} M	0,78	0,23	0,78	0,68	0,24	0,58
BK 10^{-8} M	0,13	0,06	0,09	0,25	0,08	0,18
BK 10^{-7} M	0,06	0,01	0,04	0,08	0,03	0,06
BK 10^{-6} M	0,07	0,02	0,03	0,11	0,02	0,11

keinem Inzuchtstamm an. Eine gewisse Variation in Bezug auf Alter und Geschlecht ließ sich nicht vermeiden.

Weinberg (313) berichtet, daß das terminale Ileum von weiblichen Meerschweinchen für Bradykinin etwa viermal so empfindlich ist wie das von männlichen ($\varnothing$: $K_D = 0,39 \times 10^{-8}$, σ : $K_D = 1,55 \times 10^{-8}$). Kastrierte Männchen lagen in der Empfindlichkeit dazwischen. Bei Behandlung mit β -Östradiol bzw. Testosteron näherte sich die Empfindlichkeit derjenigen von Weibchen bzw. von Männchen. Wegen dieser Geschlechtsdifferenz wurden in der vorliegenden Untersuchung für die Bradykininversuche ausschließlich Weibchen verwendet.

Da die Versuche nicht zu einer definierten Uhrzeit stattfanden und die Meerschweinchen vor Versuchsbeginn nicht fasteten, sind prinzipiell auch Unterschiede auf Grund einer circadianen Periodik oder des Nüchternzustandes möglich; es liegen allerdings keine Berichte vor, die auf eine ausgeprägte Variabilität bezüglich dieser Ursachen hindeuten.

Tabelle 4.2.

Variationskoeffizienten (VK) von Versuch zu Versuch für Bradykinin (BK), Neurotensin (NT) und Carbachol (C)

Meerschweinchenileum Rattenpfortaderlängsstreifen									
Konzentr.	n	Kontraktion (mN)		lg(Frequ.)		Basaltonus (mN)		Spitzenkraft (mN)	
		n	Effekt	VK	n	Eff.	VK	Eff.	VK
BK	10^{-9} M	8	1,74	0,78					
BK	10^{-8} M	15	12,49	0,61					
BK	10^{-7} M	18	27,31	0,27					
BK	10^{-6} M	21	13,59	0,27					
NT	$0,8 \times 10^{-9}$ M	12	3,87	1,10					
NT	$0,6 \times 10^{-8}$ M	12	15,45	0,65	9	0,27	2,16	0,11	2,39
NT	$0,6 \times 10^{-7}$ M	12	20,73	0,48	10	0,90	0,79	0,73	1,49
NT	$0,6 \times 10^{-6}$ M	12	24,14	0,42	10	1,05	0,53	1,87	0,81
								2,07	0,48
C	$0,6 \times 10^{-5}$ M	12	36,51	0,33					

Für jede Konzentration ist die Anzahl der Versuche (n), der erhaltene Effekt (Eff.) und der ermittelte Variationskoeffizient (VK) angegeben.

Die Punkte 3 und 4 der Tabelle 4.3. waren weitgehend standardisiert (s. auch 3.1.1.), Punkt 5 ist schon diskutiert worden (s. 4.1.1.1). In Bezug auf Punkt 7 sei auf 4.1.1.2. und 4.2.1.1.2.2. verwiesen.

Tabelle 4.3.

Faktoren, die die Eigenschaften glattmuskulärer Organe beeinflussen können (abgewandelt nach 14, 147)

-
- | | |
|----------|--|
| 1. Tiere | a) Spezies |
| | b) Stamm |
| | c) Gewicht |
| | d) Alter |
| | e) Geschlecht |
| | f) anderes (Östruszyklus, Jahreszeit, Circadiane Periodik) |
2. Genaue Herkunft des Gewebes, Methode der Präparation
3. Physikalische Bedingungen im Organbad
- | |
|---------------------|
| a) Lösung |
| b) Sauerstoffzufuhr |
| c) pH |
| d) Temperatur |
4. Meßtechnik
- | |
|--|
| a) Art des Präparats (ganzes Organ, Ring, Streifen usw.) |
| b) Isometrische vs. isotonische Messung |
| c) Vorspannung |
5. Sensitivitätsänderung während eines Experiments
6. Vorratshaltung
7. Zu messende Substanz
- | |
|--|
| a) Instabilität |
| b) Adsorption |
| c) Zusätze z. B. Antioxidantien, Lösungsvermittler |
-

4.1.1.2. Mögliche Fehlerquellen

4.1.1.2.1. Fehler in der Substanzkonzentration

Eine Reihe möglicher Ursachen kann dazu führen, daß die tatsächlich ans Präparat gelangende Substanzkonzentration nicht mit der berechneten übereinstimmt. Sie sind im folgenden

zusammen mit den Bemühungen, sie zu vermeiden, aufgeführt.

- Beim Abwiegen der Substanzen sind neben einfachen Wiegefehlern auch Fehler durch hygroskopische Effekte möglich. Um diese möglichst gering zu halten, wurden die Substanzen im Exsikkator aufbewahrt und in den Wägeraum der Waage ein Gefäß mit Silicagel gestellt.
- Ein Hauptproblem beim Arbeiten mit Peptiden ist die Adsorption an Glasoberflächen (147, 277), wodurch es einerseits zu einer Verminderung der Konzentration in Lösung, andererseits zu einer Verschleppung beim Verdünnen kommen kann. Als Abhilfe wurde der Zusatz von Rinderalbumin (147), Casein (311) Dithiothreitol, p-Toluensulfonsäure (109), säuregewaschenem Glas (277) oder die Benutzung von Kunststofforganbädern (147, 277) vorgeschlagen. Stabilisatoren können jedoch auch selbst pharmakologische Effekte auslösen (60). In der vorliegenden Untersuchung wurden alle Glasoberflächen, die mit den Lösungen in Kontakt kamen, mittels Vernetzer VP 1405 (Wacker-Chemie) silikonisiert. Die Lösungen wurden in Polystyrolröhrchen aufbewahrt. Für jede Verdünnungsstufe wurden silikonisierte Pipetten benutzt.
- Um einem möglichen Zerfall der Substanzen entgegenzuwirken, wurden diese lichtgeschützt, eisgekühlt und zur Verhinderung von Oxydation mit 5% CO₂/95% N₂ durchgast aufbewahrt. Ein Teil der Experimente diente zudem dazu, die konstante Aktivität der Lösungen über den üblichen Zeitraum zu überprüfen.
- Beim Einbringen der Testsubstanzen ins Organbad ist möglicherweise mit Schwankungen im Badvolumen durch Luftblasen oder mit einer nicht ausreichenden Verteilung im Organbad zu

rechnen. Die Belüftung wurde so eingerichtet, daß eine konstante Gasdurchströmung gewährleistet, diese aber so gering wie möglich gehalten war. Durch kurzzeitiges Abstellen der Belüftung konnte überprüft werden, daß nur ein relativ geringes Volumen verdrängt wurde; andernfalls wurde vor der Messung das Bad aufgefüllt. Vorversuche mit Farbstoffen zeigten, daß sich die Substanzen binnen weniger Sekunden durch Konvektion im gesamten Organbad verteilten; dem entspricht auch die schnell einsetzende Wirkung bei hohen Konzentrationen.

- Die Substanzkonzentration am Rezeptor muß nicht unbedingt mit der im Organbad übereinstimmen (147). Sie kann durch abbauende Enzyme oder Aufnahmevorgänge in der Nähe der Rezeptoren oder auf der Diffusionsstrecke zum Rezeptor vermindert sein. Die genaue Konzentration am Rezeptor läßt sich nicht überprüfen, aber es ist eher unwahrscheinlich, daß sie mit der in Lösung übereinstimmt. Im Fall von Bradykinin wurde mit dem Meerschweinchenileum sogar bewußt ein Präparat gewählt, in dem die effektive Substanzkonzentration am Rezeptor durch abbauende Enzyme (Kininase II) vermindert ist und das aus diesem Grund für reine Kinin-Untersuchungen weniger geeignet ist (227), da gerade auch die Hemmung der Kininase II gemessen werden sollte.

4.1.1.2.2. Fehler in der gemessenen Kraft

Vor Beginn eines jeden Versuchs wurden die Kraftaufnehmer mit Probegewichten auf ihre Eichung überprüft, so daß Fehleichungen der Kraftaufnehmer praktisch unmöglich sind. Eine systematische Verminderung der gemessenen Kraft wäre allerdings durch die elastischen Eigenschaften des zum Aufhängen benutzten Seidenfadens möglich; er wurde daher vor jedem Versuch so gut wie möglich gestreckt. Insgesamt sind kleinere systematische Fehler bei der Kraftmessung nicht so schwerwiegend, da durch sie nur die Absolutkraft verändert wird.

Zufällige Fehler bezüglich der Kontraktionskraft können durch

externe Störungen wie Erschütterungen durch vorbeigehende Personen usw., durch Erschütterung durch Luftblasen oder durch Schwankungen des Basaltonus verursacht werden. Wie Vorversuche zeigten, sind die ersten beiden Einflüsse vernachlässigbar gering, selbst in der Anfangsphase eines Versuchs vor Einsetzen der Spontanmotorik waren sie nicht zu bemerken. Die Schwankungen der Basallinie bilden dagegen einen wesentlichen begrenzenden Faktor der Meßgenauigkeit; auf eine Zugabe von basallinienstabilisierenden Substanzen, z.B. Hyoscin, wurde jedoch bewußt verzichtet, da die zu messenden Peptideffekte teils indirekter Natur waren.

4.1.1.2.3. Lösungsmittelleffekt

Eine sinnvolle Messung ist nur möglich, wenn das benutzte Lösungsmittel allein nicht Effekte auslöst, die dieselbe Größenordnung wie die durch die Substanz selbst ausgelösten Effekte besitzen. In der vorliegenden Untersuchung war dieses Problem etwas verschärft, da zur Aufbewahrung der Substanzen in vitro dieselbe Lösung wie für die Versuche in situ benutzt werden sollte, und diese entspricht einem künstlichen Katzenliquor. Trotzdem war der Lösungsmittelleffekt an allen untersuchten Präparaten minimal.

4.1.1.3. Zur Auswertemethode

4.1.1.3.1. Die Zunahme der Basalkraft als sinnvoller Parameter

Angesichts der z. T. relativ kurzdauernden Effekte der benutzten Pharmaka stellt sich die Frage nach einem sinnvollen Auswerteverfahren. Das Literaturstudium war hier relativ unergiebig; einige Autoren integrierten die gemessene Kraft und benutzten die so erhaltene Fläche unter der Kurve als Meßparameter (z. B. 123, 183), ein Vorgehen, das in der vorliegenden Untersuchung technisch nicht möglich war, die meisten Autoren geben die Auswertemethode jedoch nicht genau an.

Bei der Auswertung wurde unter Nichtberücksichtigung der phasischen schnellen Kraftänderung die Differenz zwischen Basaltonus vor und maximalem Basaltonus nach Substanzgabe (über 10 s gemittelt) verwendet (vgl. Abb. 2.2). Durch die Mittelung und Benützung des tonischen Kontraktionsanteils sind die maximalen Effekte etwas geringer, als wenn das absolute Maximum (=phasisches Maximum) benutzt wird. Im Endeffekt dürfte es für die Aussagekraft der Untersuchung unerheblich sein, welcher Meßparameter genau verwendet wurde; Vorversuche ergaben eine relativ gute Übereinstimmung der Dosis-Wirkungs-Kurven.

Wiegertshausen (321) schlägt ein völlig anderes Meßverfahren vor, bei dem der Effekt zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Substanzgabe gemessen wird. Da die Effekte bei höheren Konzentrationen nicht nur stärker sind, sondern auch früher eintreten, entstehen so wesentlich steilere Dosis-Wirkungs-Kurven. Das Verfahren wurde in der vorliegenden Untersuchung nicht benutzt, da damit Effekte hoher und niederer Konzentrationen nicht sinnvoll wiedergegeben werden und man in Abhängigkeit vom gewählten Meßzeitpunkt völlig verschiedene Dosis-Wirkungs-Kurven erhält. Es wurde jedoch bei einigen Versuchen die Zeit bis zum Auftreten eines Effekts gemessen.

4.1.1.3.2. Statistische Auswertung

Da die Unterschiede von Pfortader zu Pfortader bzw. von Darm zu Darm deutlich größer waren als die Variation innerhalb eines Präparates, wurden zur Auswertung nahezu ausschließlich Verfahren angewendet, die die Werte innerhalb eines Präparates miteinander vergleichen, d. h. es lag ein sogenanntes "randomi-

zed block design" vor: Page-L-Test bzw. Normal-Scores-Test, Aktivitätsvergleiche aufgrund paralleler Wirkgeraden im randomized-block-design, t-Tests für Paardifferenzen.

Zur statistischen Untersuchung auf einen linearen Trend wurde bei mehr als 3 Gruppen der verteilungsfreie Normal-Scores-Test für geordnete Alternativen im randomized-block-design von Pirie und Hollander benutzt (215), bei 3 und weniger Gruppen der Page-L-Test (211). Beide Tests sind vollständig verteilungsfrei und basieren auf Unterschieden innerhalb eines Blocks (= Präparats), werden also von Schwankungen zwischen Präparaten nicht beeinflusst. Der Pirie-Hollander-Test ist etwas unhandlicher, für $k \geq 4$ Gruppen aber effizienter als der Page-L-Test (215). Doch auch dieser verfügt, obwohl verteilungsfrei, selbst bei Vorliegen der Bedingungen für die Anwendbarkeit des F-Tests in der Varianzanalyse über eine vergleichbare, meist sogar größere Macht als der F-Test (20). Der Grund dafür ist die eingeschränkte Alternativhypothese: Der L-Test wird nur signifikant, wenn mit zunehmender Substanzkonzentration zunehmende Effekte auftreten, sei es Kontraktion oder Relaxation, was ja im allgemeinen den Erwartungen einer Dosis-Wirkungs-Kurve entspricht; die Varianzanalyse mit F-Test ergäbe dagegen auch signifikante Ergebnisse, wenn die Effekte bei verschiedenen Konzentrationen in verschiedene Richtung abweichen. Den seltenen Fall, daß sich der Effekt bei höheren Konzentrationen umkehrt, wird man in der graphischen Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve erkennen.

Bei der Interpretation der statistischen Ergebnisse ist zu beachten, daß ein statistisch signifikanter Effekt nicht unbedingt von experimenteller Relevanz ist. Es ist durchaus möglich, daß ein Effekt zwar tatsächlich vorhanden, aber so klein ist, daß er für die Untersuchung ohne Bedeutung ist, z. B. ein minimaler Lösungsmittelleffekt. Mit zunehmender Meßgenauigkeit, z. B. durch viele Wiederholungen, würde ein solcher Effekt signifikant werden. Aus diesem Grund sollte man sich auch an den wiedergegebenen absoluten Zahlen und Abbildungen orientieren. Eine weitere Hilfe ist die Angabe von r_{av} , einem

nichtparametrischen Analogon zum Korrelationskoeffizienten. Ist r_{av} betragsmäßig gleich 1, besteht ein monotoner Trend, $r_{av} = 0$ würde auf einen fehlenden Zusammenhang deuten. In allen Fällen, in denen der Page-L-Test angewandt werden konnte, wurde r_{av} nach der von Page gegebenen Formel berechnet (211).

Um Aussagen über Änderungen der Aktivität der Lösungen oder über Änderungen der Sensitivität der Präparate zu erhalten, wurden im linearen Bereich der Dosis-Wirkungs-Kurve, der aus Vorversuchen bekannt war, Wertbemessungen auf der Grundlage von 6 Meßpunkten durchgeführt (249), wobei jeweils ein Präparat als Block benutzt wurde. Es handelt sich dabei um eine Ausweitung der von Rocha e Silva benutzten Methode (240). Dieses Verfahren gestattet nicht nur die Aktivität des "unbekannten Präparats" (Bradykinin "5 h alt" bzw. Bradykinin und "Potentiator") abzuschätzen und dafür einen Vertrauensbereich anzugeben, sondern es werden gleichzeitig die Annahmen der Linearität und Parallelität der Dosis-Wirkungs-Kurven im zu messenden Bereich überprüft. Lediglich in einem einzigen Fall (Beeinflussung des Bradykinineffekts an Katzenpiaarterien durch Bradykinin Potentiator C) ergab sich bei diesen Überprüfungen eine signifikante Abweichung von der Annahme der Linearität.

In den Fällen, wo der t-Test angewandt und mehrere Vergleiche durchgeführt wurden, wurde das Verfahren nach Bonferroni-Holm (128) gewählt, um eine Überschreitung des multiplen Testniveaus zu vermeiden. Das multiple Test-Niveau wird eingehalten, wenn die Wahrscheinlichkeit, ein oder mehrere tatsächlich richtige Nullhypothesen des multiplen Tests abzulehnen, nicht größer als p ist. Ohne diese Korrektur würde ein Fehler erster Art bei n durchgeführten Testen nicht mit der Wahrscheinlichkeit p , sondern angenähert mit np auftreten, d. h. bei 10 Vergleichen mit $p < 0,01$ wird tatsächlich nur $p < 0,1$ eingehalten. Die Korrektur nach Bonferroni beruht darauf, daß man die erwünschte Wahrscheinlichkeit p durch die Anzahl der Vergleiche n dividiert, also in jedem Einzelfall nur $p < 0,001$ als signifikant betrachtet, um insgesamt $p < 0,01$ zu haben. Holm (128) verbesserte dieses Verfahren nun, indem zunächst für jeden Vergleich

der zugehörige p-Wert p berechnet wird, und jetzt das kleinste p mit p/n verglichen wird, anschließend das zweitkleinste mit $p/(n - 1)$ usw.. Sobald sich einmal ein nicht signifikanter Vergleich ergibt, wird abgebrochen und dieser und alle folgenden Vergleich als nicht signifikant betrachtet. Wie man erkennt, bietet dieses Verfahren gegenüber der einfachen Bonferroni-Methode erhebliche Vorteile besonders dann, wenn n relativ klein ist und viele Vergleiche signifikant sind.

Bei den Vergleichen Bradykinin "frisch" und "alt" wurde zudem eine Varianzanalyse mit folgenden Einzelvergleichen nach Scheffé (253) berechnet, um einen Eindruck davon zu erhalten, wie gut die einzelnen Effekte voneinander unterschieden werden können. Der Scheffé-Test gestattet, auch nachträglich entdeckte Unterschiede auf Signifikanz zu prüfen, was allerdings mit einer geringeren Effizienz der Testung erkauft wird.

Abschließend soll nochmal betont werden, daß "nicht signifikant" nicht "kein Unterschied vorhanden" bedeutet. Besonders bei kleinen Versuchszahlen und großer Variabilität ist es durchaus möglich, daß ein tatsächlich vorhandener Unterschied nicht erkannt wird. Manchmal sprechen allerdings die Abbildungen für sich.

4.1.1.4. Vergleichbarkeit von mit in-vitro-Methoden erhobenen Daten

Wenn schon zwischen den einzelnen Präparaten bei einem Experimentator deutliche Unterschiede auftreten, ist anzunehmen, daß die "selben" Präparate bei verschiedenen Experimentatoren eine noch größere Variabilität zeigen. Dies bestätigen Chase und Volicer (52), sie fanden in der Literatur Werte von 1,0 nM bis über 180 nM für eine "effektive" Konzentration von Bradykinin am Meerschweinchenileum.

Bezüglich der möglichen Ursachen der Unterschiede sei wieder auf Tabelle 4.3. verwiesen. In Tabelle 4.4. werden einige wesentliche Untersuchungen, die hauptsächlich Bradykinin oder Neurotensin betreffen, hinsichtlich der methodischen Einzelheiten verglichen:

- Spezies, Stamm, Gewicht, Geschlecht sind meistens in der Methodik angegeben, aber es ist anzunehmen, daß die Schwankungen von Labor zu Labor größer sind als innerhalb eines Labors.
- Die genaue Herkunft der augenscheinlich gleichen Präparation differiert oft, so wird bei der Pfortader häufig (z. B. 123, 184) wie in der vorliegenden Untersuchung ein Teil der Vena mesenterica superior mitbenutzt, und "Ileum" bewegt sich vom mittleren Ileum bis zu Bereichen, die nur wenige Zentimeter oberhalb der ileo-caecalen Klappe liegen. Dies kann sich durchaus auf die Reaktion des Gewebes auswirken, da Rezeptoren und Enzymaktivitäten oft heterogen verteilt sind (zahlreiche Beispiele in 147); so enthält das terminale Ileum z. B. sonst im Ileum nicht vorhandene erregende α -Rezeptoren (198).
- Die benutzten Lösungen variieren, wie aus Tabelle 4.4. zu ersehen ist, stark von Labor zu Labor; nur selten wurden die Originalrezepte von Krebs (163) und Tyrode (278) benutzt. Abweichende Ionenkonzentrationen werden z. B. dazu verwendet, die Spontanmotorik zu unterdrücken (14), es kommt aber oft auch zu einer Abschwächung der Effekte (vgl. 230, wo Krebs und Tyrode verglichen werden). In der vorliegenden Untersuchung wurde an Meerschweinchenileum und Pfortaderlängsstreifen von Ratte und Meerschweinchen eine weit verbreitete Krebs-Lösung mit 5,5 mM Glukose verwendet (wie auch in 246 und 234); die Präparation der Meerschweinchenpfortader (Gesamtorgan) wurde zusammen mit der benutzten Lösung von Schwarz (256) übernommen, die umfangreiche Untersuchungen zur Spontanaktivität der sonst selten verwen-

Na	K	Mg	Ca	Cl	Phos	SO ₄	HCO ₃	Glc	Zusätze	Vsp	Temp	Präparat	Melhart	Gas	Quelle
153	2,7	1,05	1,8	145	4,2	-	11,9	5,55		0,5	37	M I (nicht terminal)	isot.	Carb Hell	(113)
149	2,7	0,49	1,36	143	0,36	-	11,9	5,04		1	37	M TI (15 cm)	isot.	Carb Shintua	(261)
141	2,7	0,8	1,8	142	4,2	-	-	5,6	Nach bis pH 7,4	36	M TI (15 cm)	isot.	Luft Weinberg	(313)	
138	5,9	1,2	1,9	121	1,2	1,2	25	11,7		1	31	M P	isom.	Carb Carruba	(47)
143	5,9	2,0	2,5	128	1,2	2,0	25	11,2		0,4	37	R PM	isom.	Carb Helle	(123)
										0,75	37	R P	isom.	Carb Rioux	(234)
149	2,7	2,1	0,9	146	0,4	-	11,9	5,6		1,5	29	M I	isot.	Luft Segawa	(258)
149	2,7	1	3,6	147	0,4	1	11,9	5,5		0,5	37	M I (5 cm vor Ende)	isom.	Carb Kitabgi	(153)
149	2,7	1	3,6	147	0,4	1	11,9	5,5		0,2	37	M I-LS	isom.	Carb Kitabgi	(154)
160	5,7	-	2,54	165	-	-	5,95	2,77	Oxalchlorid 2 µl	0,7	37	M TI-LS	isom.	Carb Huidoro-Toro	(132)
143	5,9	1,2	2,5	128	1,2	1,2	25	5,6		1	37	M I	isot.	Carb Carraway	(41)
										1	37	M TI	isot.	Carb Rubin	(246)
134,2	5,9	1,2	2,8	131	1,2	1,2	15,5	10,1		0,5	33	R P	isom.	Carb Methison	(184)
136,5	5,9	1,2	2,5	134,2	1,2	-	14,4	11,5		3,1	37	R P (1,5 cm)	isom.	Carb Schwarz	(256)
143	5,9	1,2	2,5	128	1,2	1,2	25	5,6		1-4	37	M I	auxot.	Carb Regoli	(230)
149	2,7	1,05	1,8	145	0,42	-	12	5,6							
"Krebstlösung"										0,29	37	M I (15 cm vor Ende)	isot.	Carb Bromlee	(26)
"Krebstlösung"										2,5	37	M I (5 cm vor Ende)	isot.	Carb Day	(72)
143,5	5,9	1,2	2,5	125,7	1,2	1,2	25	11,7							Krebs-Lösung (14)
149	2,7	1,05	1,8	145	0,4	-	11,9	5,6							Tyrode-Lösung (278)
143	5,9	1,2	2,5	128	1,2	1,2	25	5,6							Lösung B
137	5,9	1,2	2,5	134	1,2	-	14	11,5							Lösung C

Tabelle 4,4

Methodischer Vergleich einiger Untersuchungen an Ileum und Pfortader. In den linken Spalten ist die Zusammensetzung der benutzten Badlösung in mM einschließlich eventueller Zusätze angegeben, es folgt die Vorspannung in g, die Temperatur in °C, die exakte Beschreibung des Präparates einschließlich des Abstands vom ileocecalen Übergang beim Ileum, die Methode, das zur Belüftung benutzte Gas und die Literaturstelle. Zum Vergleich ist die Zusammensetzung der originalen Krebs- und Tyrode-Lösung und der in dieser Untersuchung benutzten Lösungen B und C angegeben. Abkürzungen: Phos Dihydrophosphat, Glc Glucose, Vsp Vorspannung Temp Temperatur M Meerschweinchen R Ratte I Ileum TI terminales Ileum LS Längsstreifen P Pfortader PM Pfortader-V. mesenterica isot., isoton isom., isometrisch auxot., auxoton Carb Carboxy

- Eine ausreichende Sauerstoffzufuhr dürfte im allgemeinen gewährleistet sein, wobei in der Mehrzahl der Studien mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) belüftet wird. Sauerstoffmangel führt am Meerschweinchenileum zunächst zum Ausfall der nerval vermittelten Effekte bei vorläufig noch erhaltener glattemuskulärer Aktivität, wie sich an der Hemmung der Kontraktionen auf elektrische Stimulation nachweisen läßt. Dadurch können direkte und indirekte Effekte unterschieden werden (72).
- Das pH wird meist im Bereich von 7,4 gehalten (Ausnahme z. B. 256, Meerschweinchenpfortader: pH 7,25). Schwankungen im pH können einerseits die Spontanaktivität oder Reagibilität der Gewebe beeinflussen (209, 304, 305, Beispiele in 147), andererseits über Änderungen der Dissoziation die Eigenschaften der Pharmaka selbst verändern (117, 147).
- Die Temperatur beträgt in der Mehrzahl der Fälle wie in der vorliegenden Untersuchung 37 °C, teilweise werden aber auch niedrigere Temperaturen benutzt, was z. T. die Spontanaktivität reduziert (14, 147), wobei sich allerdings auch die Empfindlichkeit der Gewebe ändern kann (14). Stärkere Kühlung verhindert am Meerschweinchenileum nerval vermittelte Effekte (72).
- In der Meßtechnik zeigen sich erhebliche Unterschiede von Labor zu Labor. Auch wenn es zunächst unerheblich scheint, ob isoton oder isometrisch gemessen wird, sind einige Gewebe bei isometrischer Messung weniger empfindlich als bei isotoner (189). Für das Meerschweinchenileum scheint dies allerdings nicht zuzutreffen (62, 189).
- Mit der gewählten Vorspannung variiert auch die Länge der Muskeln, sie in sollte in Bereichen liegen, in denen maximale Kontraktionen auftreten (147). In der vorliegenden Untersuchung wird eine gute Kontraktionsfähigkeit durch die Spontanmotorik demonstriert.

- Technische Unterschiede der Präparation können die Ergebnisse oft erheblich beeinflussen. Zunächst ist es wichtig, ob Längs- oder Ringmuskulatur gemessen wird. Beide Muskelschichten haben oft deutlich verschiedene Eigenschaften (Pfortader 184, Meerschweinchenileum 26). Dabei ist aber zu beachten, daß die manchmal verwendeten Spiralpräparationen nicht unbedingt die Ringmuskulatur repräsentieren, sondern teilweise sogar paradoxe Reaktionen produzieren (147). Ein weiteres wichtiges Kriterium ist, ob die Pharmaka von der Endothel- (bzw. Mucosa-) oder von der Adventitia- (bzw. Serosa-) Seite wirken. So fanden Walker und Wilson, daß der Bradykinin-Effekt am Rattenileum und -duodenum bei mucosaler Gabe z. T. über Prostaglandine vermittelt wird, bei serosaler Gabe dagegen nicht (307, 308). Zum Studium pharmakologischer Effekte bei endothelialer Gabe schlugen Mastrangelo und Mathison die "everted" Rattenpfortader vor (183), die umgestülpt worden ist, so daß die Adventitia-Seite innen, die Endothelseite außen liegt. Ähnliche Präparationen werden auch beim Darm angewandt (z. B. 307).
- Eine gewisse Besonderheit stellt die häufig verwendete "Meerschweinchenileum-Längsmuskulatur mit Plexus-myentericus"-Präparation dar. Hier wurde der Längs- vom Ringmuskel abgelöst (Technik in 223). In der vorliegenden Untersuchung wurde bewußt die Ileum-Gesamtpräparation angewandt, da ein großer Teil der Kininase II-Aktivität in der Mucosa lokalisiert ist (85).
- Mögliche Schädigungen der Präparate können die Reaktivität beeinflussen. Die glatte Muskulatur ist zwar im allgemeinen relativ unempfindlich; ein Teil der vaskulären Effekte ist aber von der Intaktheit des Endothels abhängig (55, 288), das leicht bei der Präparation geschädigt werden kann.
- Sensitivitätsänderungen wurden schon oben erörtert.
- Instabilitäten der Substanzen, Adsorption oder Effekte von

Zusätzen werden in jedem Labor auftreten, zumindest qualitative Fehler sollten jedoch bei kritischen Arbeiten zu vermeiden sein, so daß sich aus solchen Gründen widersprechende Ergebnisse (z. B. Catecholamine: Beispiele in 147, Indomethacin 67) nur selten vorkommen sollten.

4.1.1.5. Grenzen der Technik, Vorteile der in-vivo-Präparation

Ein letzter der in-vitro-Präparation anhaftender Nachteil darf nicht unterschlagen werden: Sie repräsentieren die Reaktion von Gewebe unter weitgehend künstlichen Bedingungen, und diese Reaktion muß nicht unbedingt mit der in vivo auftretenden übereinstimmen. Besonders einschneidend ist dabei der Wegfall der extrinsischen nervalen Kontrolle und das Fehlen humoraler Gegensteuerungsmechanismen. Es ist zwar möglich, diese Effekte teilweise in vitro nachzuahmen, aber dies führt u. U. dazu, daß unter verschiedenen Bedingungen in vitro gegensätzliche Effekte auftreten und es unklar ist, welcher nun unter den Bedingungen in vivo tatsächlich auftritt.

4.1.2. Zur Methodik in situ

Die perivaskuläre Mikroapplikation von Substanzen in situ und die Messung des Gefäßdurchmessers mittels optischer Bildspaltung sind inzwischen anerkannte Methoden. Die Messungen erfolgen unter weitgehend physiologischen Bedingungen: Der arterielle PCO_2 entspricht während der Narkose weitgehend dem wachen Katzen (124, 301). Der künstliche Liquor entspricht im pH, K^+ (168, 297) und Osmolarität (301) weitgehend natürlichem Liquor. Die Reproduzierbarkeit der Durchmessermessung ist bei einer Standardabweichung von $1,2 \mu m$ (299) zufriedenstellend.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Untersuchungen am Darm

4.2.1.1. Der Effekt von Bradykinin am Meerschweinchenileum

4.2.1.1.1. Vergleich mit Literaturangaben

In der vorliegenden Untersuchung hatte Bradykinin am terminalen Meerschweinchenileum einen rein kontrahierenden Effekt, der erst nach einer Latenz von 7,2 s (10^{-6} M) bis 17,5 s (10^{-8} M) auftrat. Dies stimmt sehr gut mit den Literaturangaben über den Effekt von Bradykinin am nicht vorkontrahierten Meerschweinchenileum überein (Übersichten: 16, 52, 150, 179, 210, 277, 303; einige Einzelarbeiten: 30, 209, 223, 224, 230, 238, 240, 261, 265, 266, 332). In allen Untersuchungen wurde eine sich langsam aufbauende Kontraktion gefunden.

Im Gegensatz zum rein kontraktile Effekt am nicht vorkontrahierten Ileum fanden Hall et al. (21, 113, 114) einen biphasischen Bradykinineffekt, bestehend aus einer Relaxation, gefolgt von einer Kontraktion, wenn das Meerschweinchenileum mit Acetylcholin, Histamin, Eledoisin, Angiotensin oder Prostaglandin $F_{2\alpha}$ vorkontrahiert war. Dasselbe gilt für das durch transmurale elektrische Stimulation kontrahierte Ileum (113). Bei Vorkontraktion mit Bradykinin, Kalium oder Barium fand Hall dagegen keinen biphasischen Effekt. Die Relaxation tritt schon bei niedrigeren Konzentrationen auf als die Kontraktion (113). Hall vermutet einen direkten glattnuskulären Bradykinineffekt, wobei jedoch die Ergebnisse zur Beteiligung von α -Rezeptoren widersprüchlich sind, da Phentolamin den Effekt reduziert und Piperoxane den Effekt verstärkt (Beide sind α -Blocker) (114). Substanzen, die üblicherweise die Effekte von Bradykinin potenzieren, verstärkten auch die Bradykininbedingte Relaxation

(21).

Der unterschiedliche Effekt von Bradykinin am nicht vorkontrahierten und vorkontrahierten Meerschweinchenileum ähnelt formal den Verhältnissen beim Neurotensin (vgl. auch Diskussion unter 4.2.2.). Allerdings konnte in der vorliegenden Untersuchung ein relaxierender Neurotensineffekt auch in der benutzten, allein mechanisch vorgedehnten Ileumpräparation nachgewiesen werden. Für Bradykinin war dagegen ein relaxierender Effekt nicht nachweisbar, obwohl gezielt danach gesucht wurde.

Ein wichtiger Parameter beim quantitativen Vergleich eines Pharmakons ist die EC_{50} , die Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt auslöst, bzw. deren negativer dekadischer Logarithmus pD_2 . (In einigen älteren Untersuchungen wurde auch lediglich die Schwellenkonzentration angegeben).

Wie aus Tab. 4.5. hervorgeht, in der der in der vorliegenden Untersuchung erhaltene Wert mit einigen Literaturangaben verglichen wird, liegt der erhaltene Wert im Bereich der Literaturangaben, die allerdings relativ stark variieren.

Ein Vergleich hinsichtlich des absoluten Maximaleffekts erscheint nicht sinnvoll, da dieser in praktisch keiner Untersuchung absolut quantifiziert ist und wohl auch stark von den jeweiligen technischen Gegebenheiten abhängt. Ein relativer Vergleich ist dagegen möglich: Carbachol in der sehr hohen Dosis von $10^{-5}M$ erzielte etwa denselben Effekt (34,41 mN) wie Bradykinin in hohen Dosen (35,84 mN). Das entspricht Literaturergebnissen, die für Acetylcholin (Carbachol ist ein Muskarin-Rezeptor-agonist) und Bradykinin etwa gleich große maximale Effekte fanden (238).

In der vorliegenden Untersuchung nahm die Latenzzeit bis zum

Tabelle 4.5

Vergleich der gefundenen Empfindlichkeit mit Literaturangaben

Meßgröße	Wert	Literatur- stelle	Bemerkung
EC ₅₀	$2,4 \times 10^{-10}$ M	(224)	1)
EC ₅₀	$7,5 \times 10^{-9}$ M	(261)	
EC ₅₀	$9,8 \times 10^{-9}$ M	(30)	im Verlauf auf $3,5 \times 10^{-9}$ M abnehmend
EC ₅₀	$1,6 \times 10^{-8}$ M	vorliegende	Untersuchung
EC ₅₀	$2,0 \times 10^{-8}$ M	(210)	
EC ₅₀	$3,2 \times 10^{-8}$ M	(238)	Schätzung aus abgebildeter Kurve
EC ₅₀	$1,6 \times 10^{-7}$ M	(222)	2)
"e.K."	$1,9 \times 10^{-7}$ M	(230)	"effektive Konzentration" ("e.K.") nicht direkt mit EC ₅₀ vergleichbar

- 1) Der mit Bradykinin erzielte "maximale" Effekt ist nur ca. 80 % des mit einigen Analoga erzielten; die tatsächliche EC₅₀ dürfte deshalb geringfügig über dem angegebenen Wert, der der EC₄₀ entspricht, liegen
- 2) In der Untersuchung wird angegeben, der lineare Bereich der Dosiswirkungskurve gehe von 77 - 349 ng/ml; der angegebene EC₅₀-Wert wurde unter der (theoretisch gerechtfertigten) Annahme berechnet, daß die EC₅₀ in der Mitte des linearen Bereichs liegt.

Einsetzen des Bradykinineffekts mit zunehmender Bradykininkonzentration ab ($17,5$ s bei 10^{-8} M, $7,2$ s bei 10^{-6} M), ebenso die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kontraktion ($66,0$ s bei 10^{-8} M $17,0$ s bei 10^{-6} M). Diese Daten lassen dabei eine lineare Abhängigkeit des Logarithmus der Latenzzeit bzw. der Zeit bis zur maximalen Kontraktion vom Logarithmus der Konzentration möglich erscheinen ($r^2 = 0,94$ (Latenzzeit) bzw. $0,98$ (Zeit bis zur maximalen Kontraktion)). Interpoliert man dementsprechend, so erhält man für EC₅₀ eine Latenzzeit von $14,0$ s und eine Zeit bis zur maximalen Kontraktion von $48,5$ s. Dies entspricht sehr gut den Angaben von Paegelow (209), die im Bereich halbmaximaler Effekte eine Latenzzeit von $14,4 \pm 0,7$ s und eine Zeit von $37 \pm 1,9$ s bis zur maximalen Kontraktion fanden.

Ein Maß für die Steilheit des Anstiegs der Dosis-Wirkungs-Kurve ist nach Kenakin (147) der Quotient von A_{84} und A_{16} , den Konzentrationen, bei denen 84 bzw. 16 Prozent des Maximaleffekts erzielt werden. Liegt eine einfache Interaktion von 1 Rezeptor mit 1 Agonisten vor, die sich direkt auf das Meßparameter auswirkt, so läßt sich aus dem Massenwirkungsgesetz herleiten, daß der gemessene Effekt E sich nach folgender Gleichung aus dem Maximaleffekt E_m , der Konzentration des Agonisten A und der Dissoziationskonstante K_A berechnen läßt:

$$E = E_m \times A / (A + K_A)$$

In diesem Fall ist für $A = K_A$ $E/E_m = 1/2$, und für den Quotienten A_{84}/A_{16} läßt sich (nach einigen Umformungen) der Wert 27,5 ableiten. Wenn er experimentell ermittelt wird, kann dieser Quotient als Maß für die Übereinstimmung der gemessenen Dosis-Wirkungs-Kurve mit der unter den oben genannten Bedingungen theoretisch erwarteten benutzt werden.

In der vorliegenden Untersuchung war er bei den Vergleichen "Bradykinin frisch - 5 h alt" für Bradykinin frisch 52, bei den Kontroll-Experimenten zur Kininase-II-Hemmung, bei denen die Meßkonzentrationen dichter beieinander lagen, ergab sich 25,4 (geometrische Mittelwerte). Regoli et al. (227) fanden für das Meerschweinchenileum einen Quotienten von 40. Wie in Abb. 4.1 dargestellt ist, stimmt die erhaltene Dosis-Wirkungs-Kurve auch sehr gut mit der theoretisch berechneten überein ($r^2 = 0,997$). Dies ist angesichts der vielen möglichen Störfaktoren (Anwesenheit von Kininasen, mögliche indirekte Effekt 321) fast überraschend.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der erzielte Bradykinineffekt am Meerschweinchenileum qualitativ und quantitativ den in der Literatur beschriebenen entspricht; die Dosis-Wirkungs-Kurve stimmt mit der theoretischen überein.

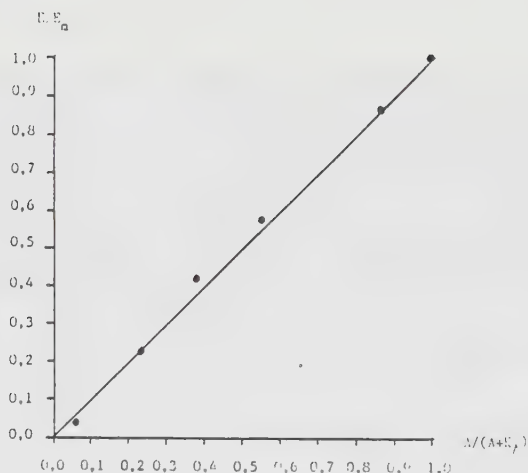


Abbildung 4.1

Übereinstimmung der Dosis-Wirkungs-Kurve für die durch Bradykinin am Meerschweinchenileum ausgelöste Kontraktion (die gemittelten Meßwerte sind als Punkte eingetragen) mit der theoretisch zu erwartenden (Gerade)
 A Konzentration des Agonisten (Bradykinin), K_A Dissoziationskonstante
 E gemessener Effekt, E_m Maximaleffekt

4.2.1.1.2. Zum Mechanismus des Bradykinineffekts am Meerschweinchenileum

Der kontrahierende Effekt von Bradykinin am Meerschweinchenileum scheint zumindest teilweise auf einem direkten glattmuskulären Angriff zu beruhen (137, 210, 303). So fanden Day und Vane (72), daß der Bradykinineffekt unter Anoxie und Kühlung erhalten bleibt, während die (nerval vermittelte) Kontraktion auf elektrische Stimulation stark abnahm, und schlossen daraus auf einen direkten glattmuskulären Effekt. Gershon (99) fand keinen Hinweis auf eine Beeinflussung des Bradykinineffekts durch Tetrodotoxin. Es ist allerdings zu beachten, daß die Aktionspotentiale einiger Neurone z.B. des AH-Typs im Plexus myentericus resistent gegen Tetrodotoxin sind (127). Der Bradykinineffekt war unbeeinflusst durch die cholinergen Antagonisten Hyoscin (26, 99) und Atropin (149, 306), durch Morphin (26, 149, 306), LSD (321), die Cholinesterasehemmer Eserin (99)

und Mipaflox (26), und durch Phenoxybenzamin (306). Es ergaben sich keine Hinweise auf eine gekreuzte Tachyphylaxie mit Substanz P (178).

Im Gegensatz dazu konnte Wiegertshausen (321) mittels genauer Analyse auch des zeitlichen Verlaufs der Kontraktion nachweisen, daß der Bradykinineffekt am Meerschweinchenileum durch Atropin und Morphin vermindert und durch den Eserin verstärkt wird, so daß ein Teil des Effekts anscheinend cholinerg vermittelt wird. In die gleiche Richtung deuten Befunde von Goldstein et al. (105), die zeigen konnten, daß Bradykinin am elektrisch stimulierten Meerschweinchenileum (Längsstreifenpräparation) die durch Opiate ausgelöste Hemmung der Motorik über einen zum Teil cholinerg vermittelten Mechanismus vermindert.

An anderen glattmuskulären Präparationen, z. B. Rattenileum bei mucosaler Bradykinin-Applikation (307, 308), ist der Bradykinineffekt zum Teil prostaglandinvermittelt. Inwieweit dies auch für das Meerschweinchenileum zutrifft, ist unklar. In dieser Hinsicht ist zu beachten, daß nach Bennett et al. (15) der Cyclooxygenasehemmer Indomethacin die Kontraktion des Meerschweinchenileums auf eine Reihe von Agonisten (elektr. Stimulation, Nikotin, Acetylcholin, Histamin) vermindert, wobei die Zugabe von Prostaglandin E_2 die normale Reaktivität wiederherstellt.

Die Kontraktion des Meerschweinchenileums ist vom Ca^{2+} -Influx abhängig (210). Außerdem fand Walascek, daß der Rezeptor bei pH 6 am empfindlichsten ist (304, 305).

4.2.1.1.3. Vergleich verschiedener Bradykininlösungen

4.2.1.1.3.1. Hinweise auf die Instabilität von Bradykinin in der Literatur

Kininlösungen sind, besonders in hohen Verdünnungen, instabil, was z. T. auf Adsorption an Glas zurückgeführt wird (277). In

der Literatur werden einige Abhilfen angegeben: So fanden Greenbaum et al. (109), daß der starke Aktivitätsverlust von Bradykinin beim Trocknen durch p-Toluensulfonsäure oder Oxalsäure verhindert werden kann. Webster und Gilmore (311) gaben Casein (0,25 %) als Stabilisator zu den Lösungen, ohne allerdings den stabilisierenden Effekt zu überprüfen. Gladner (102) benutzte nur frische, säuregewaschene Glasgeräte ohne Detergenzkontakt und fand keinen Verlust der Aktivität während eines Experimentiertages. Bei der Verwendung von Stabilisatoren ist zu beachten, daß diese unter Umständen das experimentelle Ergebnis verändern. So weist Collin (60) in einer Stellungnahme zu widersprechenden Ergebnissen von Gjuvic (101) darauf hin, daß das häufig benutzte Chlorbutol selbst deutliche pharmakologische Effekte hat.

4.2.1.1.3.2. Stabilität des Bradykinins im Laufe eines Versuchstages

In der vorliegenden Untersuchung wurde versucht, die Adsorption des Bradykinins an Glas durch die vorherige Silikonisierung der Glasgeräte mit Vernetzer VP 1405 zu vermeiden, außerdem wurden die Lösungen eisgekühlt und lichtgeschützt aufbewahrt und zur Vermeidung von Oxidation mit N_2/CO_2 begast. Um festzustellen, ob trotz dieser Vorsichtsmaßnahmen während eines Versuchstages ein relevanter Aktivitätsverlust auftrat, wurde die Aktivität frisch zubereiteter Bradykininlösungen mit der 4 - 5 h aufbewahrter am Meerschweinchenileum verglichen. An dieser Präparation besitzen Bradykininfragmente nur eine deutlich reduzierte Aktivität (224). Dabei wurden teils vollständige Dosis-Wirkungskurven, teils Einzelwerte verglichen, teils zunächst die frische, teils zunächst die 5 h aufbewahrte Lösung gemessen. Unabhängig von der Applikationsform waren die Ergebnisse jedoch gut vergleichbar und zeigten, daß 5 h aufbewahrte Bradykininlösungen dieselbe Aktivität wie frisch zubereitete Lösungen hatten (s. 3.1.2.3.1). Da in den in situ-Versuchen die Bradykininlösungen nur über eine Periode von 5 Stunden benutzt wurden, ist sichergestellt, daß auch hier die benutzten Lösungen eine konstante Aktivität aufwiesen.

4.2.1.1.3.3. Vergleich verschiedener Chargen

Um einen Einblick in die Variabilität des von verschiedenen Firmen zur Verfügung gestellten Bradykinins zu erhalten, wurde die Aktivität des in den anderen Versuchen benutzten Bradykinins von Bachem mit dem Bradykinin von Serva. Dabei zeigte sich, daß Bradykinin von Serva und Bachem bezüglich ihrer biologischen Aktivität nicht zu unterscheiden waren (3.1.1.3.2.).

4.2.1.1.4. Die Wirkung von Hemmstoffen der Kininase II am Meerschweinchenileum

4.2.1.1.4.1. Der bradykininpotenzierende Effekt verschiedener Substanzen am Meerschweinchenileum

Eine Reihe von Substanzen potenziert den Effekt von Bradykinin am Meerschweinchenileum und einer Reihe anderer Präparate. So führt Behandlung des Meerschweinchenileums mit Chymotrypsin, Chymotrypsinogen oder Trypsin zur Empfindlichkeitszunahme spezifisch für Kinine (74, 76, 311), ein Effekt, der teilweise auch an anderen Präparationen nachweisbar ist (Rattenuterus 75), teilweise zur Empfindlichkeitssteigerung des Meerschweinchenileumbioassays empfohlen wurde (277) und möglicherweise auf einer Freilegung von Kininrezeptoren (264) beruhen oder in Zusammenhang mit Prostaglandinfreisetzung stehen kann (Rattenileum (77)).

Eine Reihe von Chelatbildnern wie EDTA, 8-Hydroxycholelin und Sulfhydrylverbindungen wie Cystein, Thioglykolsäure und BAL potenzieren den Bradykinineffekt wahrscheinlich über eine Hemmung der abbauenden Metalloenzyme (87).

Zahlreiche sehr wirksame bradykininpotenzierende Substanzen sind unter den Peptiden zu finden. Hierbei lassen sich 2 Gruppen unterscheiden: Einmal aus Plasma durch Proteinasen, z. B. Trypsin, freigesetzte Proteinspaltprodukte (1, 102), wobei

in vivo wahrscheinlich den Fibrinogenspaltprodukten, die größte Bedeutung zukommt, die selbst teilweise am Entzündungsgeschehen beteiligt ist (172, 181) und die z.T. von Kininase II = Dipeptidylpeptidase = angiotensin-converting enzyme abgebaut werden und dabei den Abbau von Bradykinin kompetitiv vermindern (181). Die zweite Gruppe umfaßt Peptide aus Schlangengiften und deren Analoga, über die erstmals Ferreira 1964 berichtete (86). Ein wichtiger Wirkmechanismus liegt in der Hemmung von Kininase II (11, 201). Eine ausführliche Übersicht gibt Stewart (264); die am meisten benutzten Substanzen sind das Pentapeptid BPP_{5a}, das von Kininase II abgebaut wird, und das Kininase II-resistente Nonapeptid BPP_{9a} (s. Tab. 4.6.), die beide aus dem Gift von *Bothrops jararaca* isoliert wurden; (264). In der vorliegenden Untersuchung wurde der im Gift von *Aghistrodon halys blomhofii* enthaltene Bradykinin-Potentiator C benutzt.

Tabelle 4.6

Drei wichtige Bradykinin-potenzierende Peptide

pGlu-Trp-Pro-Arg-	Pro-Glu-Ile-Pro-Pro	BPP 9a
pGlu-Lys-Trp-Ala-	Pro	BPP 5a
pGlu-Gly-Leu-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Ile-Pro-Pro		Potentiator C

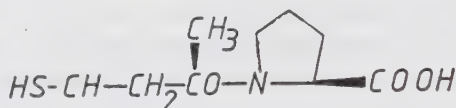


Abbildung 4.2
Struktur von Captopril

Ein großer Fortschritt wurde mit der Entwicklung von Nichtpeptidhemmstoffen der Kininase II erreicht, an zeitlich erster Stelle Captopril (Abb. 4.2, 68, 207). Es handelt sich dabei um Peptidanaloga, die so konstruiert wurden, daß sie eine hohe Affinität zum vermuteten aktiven Zentrum der Kininase II zeigen, von dieser aber nicht abgebaut werden können. Diese neuen Kininase II-Hemmer wurden inzwischen auch in der Behandlung der Hypertonie eingesetzt (70, 71), wobei v. a. die Hemmung der Angiotensin I-Aktivierung dem hypotonen Effekt

zugrunde liegen dürfte (185). Einen Überblick über die neuere Entwicklung unter Einschluß verbesserter Nichtpeptidhemmstoffe und bakterieller Hemmstoffe gibt Cohen (59).

4.2.1.1.4.2. Der Einfluß der Kininase II-Hemmer auf den Bradykinineffekt am Meerschweinchenileum

Ein wichtiger Teil der vorliegenden Untersuchung beschäftigt sich mit der Bedeutung von Kininase II für den Abbau von Bradykinin in den untersuchten experimentellen Modellen. Da sich an den Hirngefäßen in situ kein Effekt der benutzten Kininase II-Hemmer auf die Bradykinin-Wirkung demonstrieren ließ, war es zum Ausschluß methodischer Fehler wichtig, an dem im allgemeinen als Standard-assay für Kininase II-Hemmer benutzten Meerschweinchenileum (220, 247) den Effekt der Kininase II-Hemmstoffe unter den von uns benutzten Aufbewahrungs- und Applikationsbedingungen nachzuweisen. Der in der vorliegenden Untersuchung benutzte Meerschweinchenileum-assay ähnelt weitgehend dem von Rubin (246) angegebenen.

Da ein Teil der Bradykinin-potenzierenden Substanzen zu einer langdauernden Sensitivisierung des Darms führt (261, 264), wurde jeweils zunächst eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit Bradykinin allein und anschließend eine solche mit Bradykinin und Hemmstoff gemessen. In einigen Versuchen wurde zweimal eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit Bradykinin allein gemessen; die erhaltenen Kurven stimmen gut überein (Abb. 3.6) und weisen keine Änderung der scheinbaren Aktivität auf. Sie zeigen, daß die von Shimuta et al. (261) beschriebene Sensitivitätszunahme des Meerschweinchenileums bezüglich Bradykinin während der Inkubation unter den Bedingungen der vorliegenden Untersuchung keine Rolle spielt (Ausführlich Diskussion s. 4.1.1.1). Bei gleichzeitiger (Potentiator C, Captopril) und vorheriger (Captopril) Gabe eines Kininase II-Hemmstoffs kam es dagegen zu einer deutlichen Linksverschiebung der Bradykinin-Dosis-Wirkungs-Kurve. Die erhaltenen scheinbaren Aktivitäten lagen zwischen 2,03 (Potentiator C, 10^{-6} M) und 3,34 (Captopril, 10^{-7} M). Dies liegt in der Größenordnung des von Rubin (63) angegebenen Effekts (350 % Zunahme).

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit davon, ob Captopril 2 min vor oder gleichzeitig mit Bradykinin gegeben wurde. Die Bedeutung dieser Beobachtung wird allerdings dadurch etwas eingeschränkt, daß sich auch zwischen Captopril $10^{-7}M$ und $5 \times 10^{-7}M$ keine Unterschiede nachweisen ließen, was einerseits durch die für solche Vergleiche ungünstige Meßkonzeption, andererseits aber durch Auftreten des maximalen Hemmeffekts von Captopril schon bei der niedrigeren Konzentration erklärt werden kann. Die Experimente waren darauf angelegt, die Existenz eines Effekts nachzuweisen, nicht jedoch verschiedene Hemmstoffkonzentrationen miteinander zu vergleichen; die Messung mit und ohne Hemmstoff erfolgte deshalb am gleichen Darm.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß sowohl Captopril als auch Bradykinin-Potentiator C am Meerschweinchenileum einen deutlich potenzierenden Effekt auf die Bradykininwirkung hat.

4.2.1.1.4.3. Der Mechanismus der Bradykinin-Potenzierung

Um aus dem Effekt der Kininase-II-Hemmstoffe auf die Bedeutung der Kininase II für den Bradykininabbau schließen zu können, muß sichergestellt sein, daß der potenzierende Effekt tatsächlich auf der Hemmung von Kininase II beruht.

Kininase-II-Hemmer vom Typ Captopril scheinen die Potenzierung des Bradykinineffekts tatsächlich durch eine Hemmung der ACE = Kininase-II Aktivität zu erzielen (135), was sich an der Proportionalität des die Angiotensin-I-Wirkung vermindernnden und des Bradykinin potenzierenden Effekts zeigt. Der antihypertensive Effekt in vivo ist wahrscheinlich auf einen Mangel an Angiotensin II zurückzuführen (185), wozu noch ein vasodilatierender Effekt (56, 136) kommen kann. Dieser ist bei sehr hohen Dosen unspezifisch oder entsteht durch die Hemmung adrenerger Einflüsse (279); bei therapeutischen Dosen spielt eventuell eine Verhinderung des sonst vorhandenen Vasokonstriktionfacili-

tierenden Effekts von Angiotensin II, das z.B. lokal erzeugt werden kann (279), eine Rolle. Dagegen besteht keine Abhängigkeit von der Prostaglandinsynthese (287). Neben der Kininase-II-Hemmung sind unter Umständen noch weitere Effekte relevant. So hemmt das sonst sehr spezifische Captopril auch Leucinaminopeptidase (110) und hat einen antioxidativen Effekt (110). Bradykinin-potenzierende Peptide sind deutlich unspezifischer; so hemmt BPP9a auch Endopeptidase B aus Rattenhirn (182). Da mit Potentiator C und Captopril zwei chemisch stark verschiedene Hemmstoffe eingesetzt wurden und ihre Effekte weitgehend gleich waren, ist es unwahrscheinlich, daß es sich um unspezifische Wirkungen handelt.

4.2.1.1.5. Bedeutung der Kinine am Darm

Im Gegensatz zu den relativ gut charakterisierten Effekten *in vitro* ist die Bedeutung der Kinine am Darm *in vivo* noch relativ unklar (Übersichten 16, 137). Eine physiologische Rolle der Kinine erscheint jedoch möglich, da sich nicht nur zahlreiche Effekte durch Kiningabe hervorrufen lassen, sondern auch alle Komponenten eines Kallikrein-Kinin-Systems am Darm vorhanden sind: 1. Kallikrein wird im Pankreas produziert und zum Teil sezerniert (19), daneben kann man es auch im Darm nachweisen. 2. Aus Magenhomogenisation lassen sich Kinin-ähnliche Substanzen freisetzen (159). 3. Kinin-abbauende Enzyme, vor allem Kininase II, kommen in der Darmmucosa reichlich vor (85).

Die *in vivo* auftretenden Kinineffekte lassen sich nach Johnson (137) unterteilen in glattemuskuläre Effekte, z.B. Magenrelaxation, Beeinflussung der Durchblutung, z.B. Vasodilatation, Beeinflussung der Sekretion und Absorption, z.B. Stimulation der Valin-Absorption und trophische Effekte, z.B. Förderung des Wachstums der Mucosa des proximalen Dünndarms.

4.2.1.2. Der Effekt von Neurotensin am Darm

4.2.1.2.1. Vergleich mit Literaturangaben

In der vorliegenden Untersuchung führte die Applikation von Neurotensin am Meerschweinchenileum zu einer kurzzeitigen schwachen, aber statistisch signifikanten Relaxation, der eine dosisabhängige Kontraktion folgte. Andere Autoren beschrieben zunächst nur eine Kontraktion des Meerschweinchenileums durch Neurotensin (41, 258). Kitabgi und Freychet konnten zeigen, daß am mit Histamin vorkontrahierten Meerschweinchenileum der Kontraktion eine Relaxation vorausgeht, und zwar sowohl an der Ileumgesamtpräparation (153) als auch an der Längsmuskulatur-Plexus-myentericus-Präparation (154). Für letztere konnte Huidobro-Toro die Relaxation auch am rein mechanisch vorgedehntem Ileum nachweisen (132). In der vorliegenden Untersuchung wird dies erstmals auch für die Gesamtpräparation systematisch nachgewiesen. Kitabgi (153) erwähnte es für spontan kontrahiertes Meerschweinchenileum. Insgesamt läßt sich also feststellen, daß der erzielte Effekt qualitativ den Literaturangaben gleicht, wobei allerdings die initiale Relaxation am rein mechanisch vorgespannten Ileum in der Gesamtpräparation erstmals quantitativ beschrieben wird.

Die erhaltene EC_{50} wird in Tabelle 4.7. einigen Literaturangaben gegenübergestellt. Man erkennt, daß die EC_{50} in der vorliegenden Untersuchung größenordnungsmäßig im Bereich der Literaturangaben liegt.

Auch der Maximaleffekt entspricht mit 25,4 mN bzw. 74 % des cholinerg erzielbaren Effekts den von Huidobro-Toro (133) angegebenen Werten von 2,5 - 3 g, bzw. 70 % des cholinerg erzielbaren Effekts.

Der Quotient von EC_{84}/EC_{16} war 22,7 und liegt damit nahe an dem Wert für eine bimolekulare Reaktion (erwarteter Wert 27). Aus Abbildung 4.3. geht hervor, daß die erhaltene Dosis-Wirkungs-Kurve einigermaßen mit der theoretisch erwarteten übereinstimmt. Die Dauer der initialen Relaxation nahm mit zunehmender Konzen-

Tabelle 4.7

Angaben zur EC_{50} von Neurotensin (NT) am Meerschweinchenileum

EC_{50}	Präparation	Literatur und Autor	Bemerkungen
$1,2 \times 10^{-9} M$	MI-LM-PM	Huidobro-Toro (132)	
$1,3 \times 10^{-9} M$	MI-LM-PM	Huidobro-Toro (133)	
$4,2 \times 10^{-9} M$	MI-LM	Checler et al. (53)	benutzt Neostigmin 1)
$4,5 \times 10^{-9} M$	MI	Kitabgi (153)	2)
$7,4 \times 10^{-9} M$	MI	vorlieg. Arbeit	
$1 \times 10^{-8} M$	MI-LM	Kitabgi (155)	

1) Neostigmin führt zu einer Sensitisierung des MI bzgl. NT (155)

2) Der Maximaleffekt von NT war nur ca 40 % des Acetylcholin- oder Bradykinin-Effekts, bei höheren Konzentrationen kam es zur Tachyphylaxie. In der vorliegenden Untersuchung war der maximale NT-Effekt ca 71 % des maximalen Bradykinin-Effekts (35,8mN)

Benutzte Präparationen: Meerschweinchenileum (MI),
Längsmuskulatur des Meerschweinchenileums (MI-LM),
Längsmuskulatur mit Plexus myentericus (MI-LM-PM)

tration ab. Dies entspricht Angaben von Huidobro-Toro (132). In Abbildung 4.4. ist dargestellt, daß die Werte im oberen Konzentrationsbereich eine angenähert lineare Abhängigkeit der reziproken Dauer der Relaxation vom Logarithmus der Konzentration zeigen ($r^2 = 0,98$). Die maximal erreichte Relaxation (2,5 mN bei $0,6 \times 10^{-7} M$ Neurotensin) betrug nur 11 % der Kontraktion bei $0,6 \times 10^{-6} M$ Neurotensin; bei $0,8 \times 10^{-9} M$ war die Relaxation (1,5 mN) dagegen 62 % der damit erzielten Kontraktion (2,4 mN)

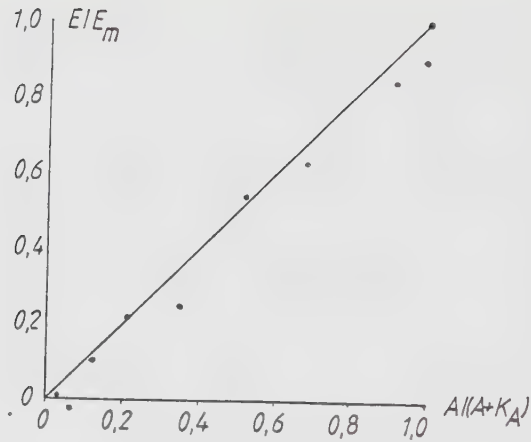


Abbildung 4.3

Übereinstimmung der Dosis-Wirkungs-Kurve für die durch Neurotensin am Meerschweinchenileum ausgelöste Kontraktion (die gemittelten Meßwerte sind als Punkte eingetragen) mit der theoretisch zu erwartenden (Gerade)
 A Konzentration des Agonisten (Neurotensin), K_A Dissoziationskonstante (=Halbwirksamkeit), E gemessener Effekt, E_m Maximaleffekt

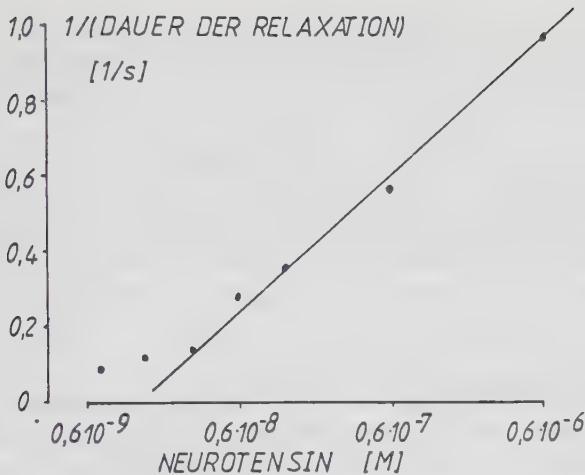


Abbildung 4.4

Abhängigkeit der Kehrwerte der Dauer der initialen Relaxation von der Neurotensinkonzentration

4.2.1.2.2. Der Mechanismus des Neurotensineffekts

Die durch Neurotensin hervorgerufene Kontraktion wird durch Tetrodotoxin gehemmt (132, 153, 154, 334); sie wird also vermutlich neural vermittelt. Tetrodotoxin hemmt den schnellen Na^{+} -Kanal der Nervenzellen. Entsprechend führt Neurotensin zur Depolarisation von Neuronen des Plexus myentericus (325). Bei hohen Neurotensin-Konzentrationen zeigt sich allerdings ein Tetrodotoxin-resistenter (myogener?) Anteil (133). Ein Teil des Effekts wird cholinerg vermittelt: Acetylcholin-Esterase-Hemmer wie Neostigmin führen zu einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve (155); Atropin reduziert den Neurotensin-Effekt (133, 153, 155, 334); Neurotensin setzt Acetylcholin aus Synaptosomen frei (328). Der atropinresistente, also vermutlich nicht durch Acetylcholin vermittelte Anteil der Kontraktion wird durch vorherige Desensitivierung gegen Substanz P aufgehoben (193), ist also vermutlich zum Teil durch Substanz P vermittelt. Opioide, u. a. Dynorphin und Benzomorphone (z.B. bei Ethylketocyclazocine) hemmen den Neurotensin-Effekt vermutlich über Kappa-Rezeptoren (133, 194, 334). Auch Somatostatin ver-

mindert die Neurotensin-Kontraktion (194), TRH und Adrenalin führten zu einer Rechtsverschiebung (133). TRH ist auch im Zentralnervensystem ein Gegenspieler von Neurotensin (263).

Die durch Neurotensin ausgelöste Relaxation ist dagegen tetrodotoxin-resistent, wird jedoch durch Apamin, einen Hemmstoff gewisser Ca^{2+} -abhängiger K^{+} -Kanäle (131, 243) nichtkompetitiv und unspezifisch gehemmt (133). Das spricht eher für einen direkten myogenen Effekt (Vgl. auch die Diskussion beim Bradykinin in 4.2.1.1.2.).

Ein weiterer Hinweis auf einen zumindest teilweise direkten relaxierenden Neurotensineffekt an der Längsmuskulatur ergibt sich aus der Existenz spezifischer Neurotensin-Bindungsstellen an Membranen von Längsmuskelzellen, deren scheinbare Affinität der EC_{50} des relaxierenden Effekts entspricht und deren Bindungsaffinität für Analoga etwa parallel zu deren relaxierender Potenz verläuft (154). Auch an der Ringmuskulatur des Meerschweinchenileums, die zahlreiche Neurotensin-Rezeptoren enthält (103), hat Neurotensin einen tetrodotoxin-resistenten, apamin-sensitiven relaxierenden Effekt (103). Da Neurotensin-Antikörper den Effekt von Feldstimulation vermindern, hat Neurotensin in der Ringmuskulatur anscheinend teilweise die Funktion eines Neurotransmitters (103).

4.2.1.2.3. Die Bedeutung des Neurotensins am Darm

Auch im Fall von Neurotensin kann man nicht direkt aus der Existenz glattemuskulärer Effekte in vitro auf die Bedeutung in vivo schließen. Es ist nur sinnvoll, eine physiologische Relevanz von Neurotensin am Darm anzunehmen, wenn sich die Komponenten eines Neurotensinsystems dort nachweisen lassen.

Das trifft jedoch zu: Der Hauptteil des gesamten Körperneurotensins ist (bei der Ratte) im Darm lokalisiert, vor allem in N-Zellen der Mucosa des Ileums (44, 129); das aus dem Darm isolierte Neurotensin entspricht zumindest zum Teil (40, 116, 129, 151) dem der Spezies entsprechenden Tridekapeptid. Neuro-

tensin-Immunoreaktivität findet man auch, allerdings nur spärlich, in Nervenfasern im Meerschweinchendarm (176, 231, 232). Im Widerspruch zu diesen Untersuchungen steht Schulzberg (254), der Neurotensin in Nervenfasern nur bei der Ratte und nicht beim Meerschweinchen gefunden hat. Neurotensin tritt nicht in peripheren Nervenzellen auf (176, 231, 254). Neben möglichen anderen Enzymen können auch die in der Darmmucosa vorhandene Kininase II (85) und Enkephalinase (98) Neurotensin abbauen (262).

Entsprechend der zweifachen Verteilung von Neurotensin im Darm (N-Zellen und Nervenfasern) sind 2 Typen physiologischer Wirkungen zu erwarten:

1. Effekte des Neurotensins der N-Zellen parakriner oder endokriner Art (242),
2. Effekte des Neurotensins der Nervenfasern.

Neurotensin wird bei der Perfusion des Dünndarms mit Lipidlösungen freigesetzt (88) und führt in physiologisch auftretenden Konzentrationen nach Feurle (89) zur Hemmung der Magenmotilität und des unteren Ösophagus sphinkters, zur Vermehrung des Blutflusses in Pankreas und Ileum (s. 122), zur Sekretion von Pankreatischem Polypeptid, von Sekretin potenziert (164) zur Hemmung der Pepsinsekretion des Magens und zur Stimulation der Pankreassekretion. Motorisch wurde in vivo u. a. eine α_2 -adren-erg vermittelte Relaxation des feldstimulierten Hundedarms (251), eine Verstärkung der Colon-Motilität des Hundes (27), die teilweise Prostaglandin-abhängig (12) ist und eine Mitwirkung bei der Umstellung der Nüchternmotilität auf nach Fütterung beobachtete Darmmotilität der Ratte (3, 322) und des Hundes (27) beobachtet. Insgesamt sind jedoch noch keine sicheren Schlüsse möglich (17)

4.2.1.3. Vergleich des Effektes von Neurotensin mit dem von Noradrenalin und Carbachol

Noradrenalin und Carbachol, deren Effekte auf das Ileum aus der Literatur bekannt sind, wurden eingesetzt, um die Reaktivität

der Präparate mit einem anerkannten Standard zu prüfen und einen Vergleich der Neurotensineffekte mit dem Standard zu ermöglichen. Die nach Noradrenalin beobachtete Hemmung der Spontanmotorik entspricht Literaturangaben (162). Gelegentlich wurde auf Noradrenalin $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ eine Kontraktion beobachtet, was sich durch das variable Vorhandensein exzitatorischer Alpha-Rezeptoren am terminalen Meerschweinchenileum erklären läßt (198). Carbachol wurde als cholinerg Agonist eingesetzt; der kontrahierende Effekt von Acetylcholin wird häufig als Kontrolle verwende (153, 238). In der vorliegenden Untersuchung betrug die maximale mit Neurotensin erzielte Kontraktion ca. 70% der cholinerg erzielbaren, dies entspricht den Literaturwerten.

4.2.2. Diskussion der Ergebnisse an der Pfortader

4.2.2.1. Der Effekt von Neurotensin an der Rattenpfortader

Neurotensin führte an der Rattenpfortader zu einer Zunahme der Frequenz der Spontankontraktionen, des Tonus und der phasischen Kontraktionen. Dies entspricht Angaben von Helle (123) und Rioux (234, 237). Die von Helle angegebene Halbwirkdosis ($\text{EC}_{50} 3,6 \times 10^{-8} \text{ M}$) liegt größenordnungsmäßig im Bereich der in der vorliegenden Untersuchung für die einzelnen Parameter gefundenen Halbwirkdosis.

Nach Rioux (234) wird der Neurotensineffekt an der Rattenpfortader von Phentolamin, Atropin, Methysergid, Diphenhydramin, Cimetidin und Leu^8 - Angiotensin II nicht beeinflusst, so daß eine adrenerge, cholinerge, serotoninerge, histaminerge oder angiotensinerge Vermittlung unwahrscheinlich ist; Antiphlogistika wie Indomethacin, Acetylsalicylsäure, Mefenaminsäure, Hydrocortison und der Phospholipase- A_2 -Hemmer Mepacrin reduzierten allerdings den Neurotensineffekt (234), was eine teilweise Vermittlung oder Fazilitierung durch Prostaglandine wahrscheinlich macht.

4.2.2.2. Fehlen eines Neurotensineffekts an der Meerschweinchenpfortader

Im Gegensatz zur Rattenpfortader zeigte die Meerschweinchenpfortader als ganze Vene und als Längsstreifenpräparat keine Änderung der Spontanmotorik.

Dabei wurden jeweils parallel zur Meerschweinchenpfortader mit denselben Neurotensinlösungen Effekte am Meerschweinchenileum oder an der Rattenpfortader erzielt, so daß höchstens eine partielle Inaktivierung des Neurotensins durch Adsorption oder Abbau vorliegen kann, die aber angesichts der höchsten benutzten Konzentration ($10^{-5}M$) keine entscheidende Rolle spielen dürfte. Tachyphylaxie als Ursache des fehlenden Effekts erscheint ausgeschlossen, da einerseits sehr lange Applikationsintervalle gewählt wurden, andererseits teilweise sofort sehr hohe Konzentrationen getestet wurden. Eine allgemeine Schädigung des Gefäßes bei der Präparation mit folgender unspezifischer Reaktivität ist ausgeschlossen, da die Meerschweinchenpfortader die von Schwarz (256) beschriebene Spontanmotorik und die in der Literatur beschriebenen Effekte auf Noradrenalin (47, 256) und Bradykinin (47) zeigte; der Effekt des Muskarinrezeptoragonisten Carbachol entsprach dem von Acetylcholin (47, 256).

In einer Übersichtsarbeit beschäftigt sich Robinson (239) mit dem Phänomen der Speziesdifferenz von Eigenschaften der Blutgefäße und kommt zu dem Schluß, daß eine Reihe sogenannter "Speziesdifferenzen" eher methodische Differenzen widerspiegeln; in dieser Hinsicht ist zu beachten, daß Mathison (184) an der Rattenpfortader nur an den Längs-, nicht aber an der Ringmuskulatur einen Neurotensineffekt fand. Außerdem konnten Mastrangelo und Mathison (183) zeigen, daß zwischen Pfortader in Gesamtpräparation und Längsstreifenpräparation pharmakologisch Unterschiede bestehen. Die ursprünglich benutzte Meerschweinchenpfortaderpräparation ist eine Gesamtpräparation, die Rattenpräparation dagegen eine Längsstreifenpräparation. Um Fehlinterpretationen durch solche methodischen Unterschiede auszuschließen, wurde zusätzlich zur Gesamtvene eine Längsstreifenpräparation der Meerschweinchenpfortader benutzt, wobei neben der Präparationsmethode die Badlösung und die Vorspan-

nung vollständig den Versuchen mit der Rattenpfortader entsprachen. Da sich auch hier kein Neurotensineffekt zeigte, wurde gefolgert, daß es sich tatsächlich um eine Speziesdifferenz handelt. Die Annahme, daß diese darauf beruht, daß das in der Untersuchung benutzte Neurotensin vom Rind (und Menschen), dessen Sequenz sich in einer Aminosäure von der beim Meerschweinchen unterscheidet (259) prinzipiell beim Meerschweinchen unwirksam ist, wird durch die am Meerschweinchenileum demonstrierten Effekte widerlegt.

Man könnte argumentieren, daß ein relaxierender Effekt von Neurotensin übersehen worden sein könnte, weil die Mehrzahl der Versuche an nicht vorkontrahierten Gefäßen durchgeführt wurde. In einzelnen Versuchen wurde deshalb Neurotensin an mit Noradrenalin vorkontrahierten Gefäßen getestet, ohne daß sich die Andeutung eines Effektes ergab.

4.2.2.3. Die Bedeutung von Neurotensin an der Pfortader

Derzeit sind keine Studien in vivo zum Effekt von Neurotensin auf die Pfortader bekannt. Für eine physiologische Bedeutung spricht das Vorliegen einer relativ ausgeprägten Neurotensin-immunoreaktiven Innervation der Pfortader bei Meerschweinchen und Hund (231), so daß Neurotensin möglicherweise eine Rolle bei der neurogenen Regulation der portalen Durchblutung spielen könnte (231). Daneben wäre eine Beeinflussung der Pfortader durch im Darm freigesetztes Neurotensin denkbar (123). Da bisher jedoch nahezu alle Untersuchungen über den Neurotensineffekt an der Pfortader der Ratten gemacht wurden, ist in Anbetracht der oben beschriebenen, speziesabhängig unterschiedlichen Effekte ein teilweises Neuüberdenken der bisherigen Konzepte nötig. Neurotensin könnte z. B. den Effekt oder die Freisetzung anderer Neurotransmitter (vasoaktives intestinales Peptid (VIP), Substanz P, 231) regulieren.

Speziesdifferenzen zwischen Ratten-, Meerschweinchen- und Kaninchenpfortader sind schon von anderen Autoren beschrieben worden. So fand Carruba (47), daß Angiotensin und Nikotin die

Rattenpfortader, aber nicht die Meerschweinchenpfortader kontrahieren, für Noradrenalin, Adrenalin, Tyramin, Bradykinin, Physalaemin, Oxytocin, Vasopressin, Caerulein, Acetylcholin, Serotonin, Ephedrin und BaCl_2 waren die Effekte dagegen gleich. Burnstock et al. (28) fand Hinweise auf eine purinerge inhibitorische Innervation der Kaninchen-, nicht aber der Meerschweinchenpfortader.

4.2.3. Diskussion der Ergebnisse an den Hirngefäßen

4.2.3.1. Der Effekt von Bradykinin an Hirngefäßen

4.2.3.1.1. Kinineffekt an Hirngefäßen

Bradykinin führte in der vorliegenden Untersuchung bei Mikroapplikation in situ an cerebralen Arterien und Arteriolen der Katze zu einer dosisabhängigen, reversiblen Dilatation, die unabhängig vom Ausgangsdurchmesser ist. Dieser Effekt stimmt überein mit den Effekten von Bradykinin, die in zahlreichen Untersuchungen in vitro und in vivo an peripheren Arterien gefunden wurden (Übersichten 137, 226, 227). Bradykinin führt in der Peripherie meist zu einer Konstriktion der Venen, während die Arterien in Abhängigkeit von Strombahn, Spezies und experimentellen Bedingungen mit Relaxation oder Konstriktion reagieren. Hirngefäße unterscheiden sich anatomisch und funktionell von den Gefäßen anderer Organe (Übersicht 31, 160), so daß an anderen Gefäßen erzielte Ergebnisse nicht direkt auf sie übertragen werden können. Vor Beginn der vorliegenden Untersuchungen existierten jedoch nur wenige Studien zum Bradykinineffekt an Hirngefäßen in vitro (4, 5, 118, 276), Studien in situ fehlten.

Zudem sind die Ergebnisse in Abhängigkeit von Technik, Gefäß und Spezies variabel (s. Tab. 4.8). An nicht vorkontrahierten Arterien in vitro kommt es zur Kontraktion oder es fehlt ein Effekt; unter speziellen Bedingungen, wie Indomethacin, Phentolamin, Propanolol und Atropin im Organbad können jedoch auch

Tabelle 4.8

Kinineffekt auf Hirngefäße - Ergebnisse in vitro

Spezies	Gefäß	Vorkontraktion	Reaktion	Literaturstellen
Mensch	A. basilaris	-	kein Effekt	5
		+	Relaxation	276, 317
	A. cerebri post.	+	Relaxation	276
		-	kein Effekt	301
	Piaarterien	+	Relaxation	120, 301
		-	kein Effekt	301
Katze	A. basilaris	-	kein Effekt	318, 319
		+	kein Effekt	276, 318, 319
	A. cerebri media	-	kein Effekt	301
			Kontraktion	118
			Relaxation*	280
		+	Relaxation	115, 120, 290, 301, 318, 319, 320
	Piaarterien	-	kein Effekt	301
		+	Relaxation	301
	A. basilaris	-	Kontraktion	4, 276
		+	Relaxation	146
	A. cerebri media	-	Kontraktion	276
Hund	A. cerebri post.	-	Kontraktion	276
Kaninchen	A. basilaris	+	Relaxation	16, 120, 276, 316
			Kontraktion	16, 316**

*) in Gegenwart zahlreicher Antagonisten

**) Umschlag von Relaxation in Kontraktion bei mehrfacher Gabe im Verlauf von Stunden

trahierten Gefäßen wirkt Bradykinin dilatierend, lediglich bei der Arteria basilaris gibt es speziesspezifische Ausnahmen, so hat Bradykinin an der A. basilaris der Katze nahezu keinen Effekt (318, 319), und beim Kaninchen wird der B_2 -vermittelte dilatierende Effekt während der Inkubation im Verlauf von Stunden vom B_1 -vermittelten konstringierenden Effekt überlagert (316, 320). Die vorliegende Untersuchung zeigt, daß in situ zumindest an den Piaarterien der Katze ein deutlicher dilatierender Effekt besteht. In dieselbe Richtung deuten Experimente, in denen eine Superfusion einer Hemisphäre mit Bradykininlösung vorgenommen wurde (286); unter diesen Bedingungen dilatierten die Arteriolen, während es zu einer Abnahme des Venendurchmessers kam. Inzwischen wurde auch bei anderen Spezies ein dilatierender Effekt in situ gefunden (z.B. Kaninchen 140, 141).

4.2.3.1.2. Vergleich des Bradykinineffekts mit den anderen Substanzen

Unter den gleichen oder ähnlichen Bedingungen wie in der vorliegenden Untersuchung konnte auch für eine Reihe anderer Substanzen ein vasodilatierender Effekt auf die Piaarterien der Katze in situ nachgewiesen werden. Aus den in Tabelle 4.9 zusammengestellten Ergebnissen geht klar hervor, daß Bradykinin in einem den anderen Substanzen vergleichbaren Konzentrationsbereich dilatatorisch wirkt und zu den Substanzen gehört, die den stärksten Maximaleffekt auslösen. Dabei ist zu bedenken, daß wegen der Abhängigkeit des Widerstands von der 4. Potenz des Durchmessers eine Dilatation um 45 % einer Reduzierung des Widerstands um den Faktor 4,4 (77 %) entspricht. Allerdings ist der Schluß vom Durchmesser auf den Blutfluß nicht immer richtig, da auch vor- und nachgeschaltete Gefäße zum Widerstand beitragen (31).

Tabelle 4.9

Effekt verschiedener Substanzen auf Piaarterien der Katze in situ

Substanz/Reiz	EC ₅₀	Maximal- effekt	Literatur- stelle
Bradykinin	4,4 x10 ⁻⁷ M	45.5 % D	vorlieg. Arbeit
CGRP		D	78
Leu-Enkephalin	1,12x10 ⁻⁴ M	7,6% D	294
PHI (Peptid HI)		D	80
Substanz P		19 % D	81
VIP		20 % D	312
Adenosin	7,4 x10 ⁻⁷ M	30 % D	295
Carbachol		20 % D	170
Histamin	9,95x10 ⁻⁸ M	33 % D	296
Serotonin		38 % D	121
		32 % D	10
Prostaglandine E ₂		53 % D	83
I ₂		40 % D	83
F _{2a}			D 293
G ₂		65 % D	83
Neurotensin		-	vorlieg. Arbeit
Cholecystokinin-8		-	186
Angiotensin	7,94x10 ⁻⁸ M	35 % K	Whalley, Wahl (unveröff. Daten)
Neuropeptid Y	3,2 x10 ⁻⁸ M	34,7% K	79
Noradrenalin	1,2 x10 ⁻⁶ M	27,4% K	165

D bedeutete Dilatation, K Konstriktion. VIP Vasoaktives intestinales Peptid, CGRP Calcitonin Gene Related Peptide

4.2.3.1.3. Wirkungsmechanismus von Bradykinin

Zahlreiche Studien in vitro zeigen, daß bei Katze (120, 290), Mensch (120, 317), Hund (146) und Kaninchen (120) der relaxierende Effekt des Bradykinins vom Kontakt der glatten Muskulatur mit dem Endothel abhängt. Das läßt sich dadurch erklären, daß Bradykinin zunächst das Endothel veranlaßt, Substanzen freizusetzen, die relaxierend wirken. So postulierte Furchgott (94)

einen chemisch noch nicht genau definierten, jedoch nicht zu den Prostaglandinen gehörigen "endothelium-derived relaxing factor", der über eine Stimulierung der Guanylat-cyclase die Muskelrelaxation auslöst. Da Bradykinin in situ nur bei perivaskulärer (301, 302, 318, 319), nicht jedoch bei intravaskulärer Gabe (286) relaxierend wirkt, greift Bradykinin wohl an der extraluminalen Endothelseite an, oder die Bindung an Rezeptoren der glatten Muskulatur führt zu einer Weitergabe der Information an das Endothel, von dem die Information zur Dilatation an die glatte Muskelzelle wieder zurückgegeben wird.

Eine Reihe von Untersuchungen beschäftigen sich mit der Frage, ob der Bradykinin-Effekt durch weitere Substanzen vermittelt wird. Dabei scheinen Speziesunterschiede zu bestehen: So ist der Cyclooxygenase-Inhibitor Indomethacin ohne Einfluß auf den Bradykinin-Effekt an der vorkontrahierten Arteria cerebri media der Katze (318, 319) und der Arteria basilaris des Menschen (317) in vitro, verhindert dagegen beim Kaninchen die Bradykinininduzierte Dilatation der A. basilaris in situ vollständig (141). Auf die Beteiligung von Lipoxxygenaseprodukten deutet, daß der Cyclo- und Lipoxxygenase-Inhibitor BW755, nicht jedoch der Cyclooxygenaseinhibitor Indomethacin die Dilatation der A. basilaris des Menschen vermindert (317). Die Verminderung der Bradykinin-induzierten Dilatation der Piaarterien der Katze in situ durch Superoxiddismutase und Catalase (161) weist auf die Beteiligung von Wasserstoffperoxid und freien Radikalen als Mediatoren.

4.2.3.2. Bedeutung der Kininase II für den Kinin-Abbau im Gehirn

4.2.3.2.1. Effekt von Hemmstoffen der Kininase II

Ein Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Bedeutung von Kininase II für den Abbau von perivaskulär mikroappliziertem Bradykinin zu erfassen. Dazu wurde der Effekt von Bradykinin allein mit dem von Bradykinin und gleichzeitig appliziertem Hemmstoff verglichen, nachdem zuvor festgestellt worden war,

daß der Hemmstoff allein keinen wesentlichen Einfluß auf den Durchmesser der Piaarteriolen hat (s. 3.2.3). Nimmt man an, daß sich auf dem Diffusionsweg zum Bradykininrezeptor oder in seiner unmittelbaren Nachbarschaft relevante Mengen Kininase II befinden, so müßte es bei Hemmung der Kininase II zu einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve kommen (147). Dies konnte in der vorliegenden Untersuchung auch am Meerschweinchenileum in vitro, einer Präparation, an der bekanntermaßen Kininase II für den Bradykininabbau eine wesentliche Rolle spielt, demonstriert werden (s. 3.1.2.4). In diesen Versuchen ergab sich gleichzeitig, daß kein wesentlicher Unterschied im erzielten Effekt besteht, je nachdem ob mit Hemmstoff vorinkubiert wird oder wie in situ Bradykinin und Hemmstoff gleichzeitig gegeben werden. Die beiden benutzten Kininase-II-Hemmer sind weitgehend spezifisch (vgl. 4.2.1.1.3.3) und chemisch stark voneinander verschieden; Potentiator C ist ein Peptid, Captopril nicht, so daß es unwahrscheinlich ist, daß die gleichen unspezifische Wirkungen bei beiden Substanzen auftreten.

In den Versuchen ergab sich kein Unterschied der Bradykinin-Dosis-Wirkungs-Kurven mit und ohne Kininase-II-Hemmstoff. Daraus kann gefolgert werden, daß Kininase II keine Bedeutung für den Abbau von Bradykinin in Rezeptornähe oder auf dem Diffusionsweg dorthin hat oder nicht vorhanden ist.

4.2.3.2.2. Vergleich mit anderen Ergebnissen

Das obige Ergebnis stimmt gut überein mit Untersuchungen von Whalley und Wahl (319), die fanden, daß Kininase II (= Angiotensin-converting-Enzyme)-Hemmstoffe keinen Einfluß auf den Bradykinin-Effekt an der Arteria cerebri media der Katze in vitro hat (319). Der Effekt von Angiotensin I, das ohnehin nur ca. 1/10 der Potenz von Angiotensin II hatte, wurde dagegen noch weiter abgeschwächt (319). Dies zeigt, daß Kininase II an den Gefäßen zwar vorhanden ist, aber im Verhältnis zu anderen Enzymen mit Kininase-Aktivität zu inaktiv ist, zu niedrige Affinität zum Bradykinin hat oder sich nicht nahe genug am Bradyki-

ninrezeptor befindet, um den Bradykinineffekt zu beeinflussen. Im scheinbaren Gegensatz zu diesen Ergebnissen fanden Kariya et al. (145), daß die Halbwertszeit von intraventrikulär appliziertem Bradykinin in Ratten durch Kininase-II-Hemmer verlängert wird. Dabei wurden allerdings die etwas weniger spezifischen Potentiatoren B und SQ14225 eingesetzt. Zahlreiche weitere Studien (23, 95, 100, 212, 217, 326, 327) wiesen Kininase-II-Aktivität im Hirn, besonders in Hirngefäßen, nach. Der Widerspruch ist jedoch nur ein scheinbarer, da eine relevante Beeinflussung der tatsächlichen Bradykininkonzentration am Rezeptor und damit des Bradykinineffektes nur durch ausreichende Mengen von Kininase II in unmittelbarer Rezeptornähe oder auf dem Diffusionsweg zum Rezeptor erfolgen kann; die Halbwertszeit von Bradykinin im Liquor wird dagegen von der Kininase-Aktivität im Liquor und angrenzenden Strukturen bestimmt. Auch innerhalb der Gefäße gibt es Variationsmöglichkeiten bezüglich der Kininaselokalisation; so wäre Kininase-II-Aktivität lumenseitig im Endothel ohne Einfluß auf perivaskulär appliziertes, möglicherweise direkt am glatten Muskel angreifendes Bradykinin.

4.2.3.2.3. Mögliche Funktionen der Kininase II

Nachdem Kininase-II-Aktivität im Gehirn u. a. auch in der Gefäßfraktion vorhanden ist, aber für den Metabolismus des von perivaskulär aus wirkendem Bradykinin keine Bedeutung hat, stellt sich natürlich die Frage, ob und welche Funktionen sie haben könnte. Hierzu gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten:

- Einmal kann Kininase II tatsächlich Kinin abbauen, aber an anderer Stelle. So hat intravaskulär gegebenes Bradykinin keine vasomotorischen Effekte (286), was zeigt, daß es die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann. Möglicherweise tritt hier neben die anatomische Barriere (31) eine metabolische Barriere in Form von im Endothel lokalisierter Kininase II. Daneben konnten Kinin-immunoreaktive Substanzen auch in Neuronen nachgewiesen werden (64); sollten diese als Neurotransmitter wirken, könnte Kininase II eine Rolle beim Abbau

am synaptischen Spalt spielen.

- Andererseits ist Kininase II eine weitgehend unspezifische Peptidase, die neben Kininen auch Angiotensin I, Substanz P (275, 329), Substanz K (275), Neurotensin (262) und Enkephaline (262) als Substrate benutzen kann. Alle angeführten Substanzen sind im Gehirn vorhanden (231, 275), dort teilweise neuronal lokalisiert und gelten als Neurotransmitterkandidaten. Kininase II läßt sich teilweise dort nachweisen, wo auch diese Peptide konzentriert sind, und könnte eine wesentliche Rolle bei ihrem Metabolismus spielen (96, 275). Für die am Gefäß lokalisierte Kininase II konnte das für die Aktivierung von Angiotensin I zu Angiotensin II in vitro (319) und in situ (Whalley et al., in press) nachgewiesen werden.

4.2.3.3. Die Bedeutung der Kinine für die zerebrale Zirkulation

4.2.3.3.1. Bedeutung der Kinine unter physiologischen Bedingungen

Ergänzend zu der vorliegenden Untersuchung konnten Unterberg et al. (285, 286) zeigen, daß Bradykinin durch Superfusion perivaskulär gegeben den Durchmesser von Venen vermindert und die Permeabilität für kleine (Fluoreszein), nicht aber für große (Fluoreszein-Dextran-Komplex) Substanzen erhöht. Intravaskulär gegebenes Bradykinin hatte dagegen nur einen permeabilitätserhöhenden Effekt (286). Diese in Abhängigkeit von der Applikationsform unterschiedlichen Effekte passen gut zur Annahme einer Blut-Hirn-Schranke für Bradykinin.

Es stellt sich die Frage, inwieweit die beschriebenen Effekte von Bradykinin unter physiologischen Bedingungen eine Rolle bei der Regulation der zerebralen Durchblutung spielt. Um einen solchen Nachweis zu führen, müßte man (1) zeigen, daß Bradykinin unter physiologischen Bedingungen vorhanden ist oder generiert wird und (2), daß Bradykinin Effekte hat. Bestärkend wäre (3) der Nachweis eines Bradykinin eliminierenden Systems und

(4) der Nachweis, daß Bradykininantagonisten den Bradykinineffekt aufheben und eventuell die zerebrale Durchblutung beeinflussen. Punkt 2 und 3 wurden schon behandelt und können bejaht werden. Zu Punkt 1 ist festzustellen, daß Kininproduzierende Aktivität (51, 130, 144) und Kininogen (141), bzw. Kininähnliche Substanzen (64, 214, 260) im Gehirn nachgewiesen wurden. Allerdings ist nicht bekannt, in welchen Konzentrationen die Kinine auch an den Gefäßen und ihrer unmittelbaren Umgebung auftreten. Zu Punkt 4 ist zu bemerken, daß der Kinin-Effekt über B_2 -Rezeptoren vermittelt wird (318) und B_2 -Rezeptor-Antagonisten, wie $\text{Thi}^{5,8}\text{Phe}^7$ -Bradykinin (225, 289) zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht zur Verfügung standen. Mittlerweile ist aber in vitro der dilatationshemmende Effekt der B_2 -Antagonisten an Hirngefäßen des Menschen gezeigt worden (315a). Insgesamt ist eine Beeinflussung der zerebralen Zirkulation durch Kinine unter physiologischen Gegebenheiten derzeit noch nicht völlig sicher nachgewiesen.

4.2.3.3.2. Bedeutung der Kinine unter pathophysiologischen Bedingungen

Kinine sind wesentliche Mediatoren der Entzündungsreaktion (181) und es liegt daher die Annahme nahe, daß sie ihren Einfluß auf den Hirnkreislauf u. a. auch unter pathophysiologischen Bedingungen ausüben. Tatsächlich konnte die Arbeitsgruppe um Professor Baethmann (180, 280, 281, 283, 284) zeigen, daß Kinine nach Hirntrauma entstehen und unter gewissen Bedingungen eine wesentliche Rolle bei der Genese des Hirnödems und des sekundären Hirnschadens spielen. So tritt bei der Katze nach Kältetrauma das Plasmakininogen in das fokale nekrotische und das perifokale Gewebe über und es werden dort Kinine freigesetzt (180). Dabei findet man bis 200 ng Bradykinin/g Frischgewebe im perifokalen Gewebe, im nekrotischen sogar bis 600 ng/g. Dies wird durch die durch den Anstieg des intrazerebralen Druckes ausgelöste Ischämie noch verstärkt, so daß Bradykinin-Konzentrationen bis 10^{-6}M erreicht werden. Bei diesen Konzentrationen sind vasomotorische und permeabilitätssteigernde Effekte zu erwarten, und bei Hunden konnte ein signifikanter

Anstieg des Gewebswassergehalts in grauem und weißem Gewebe gefunden werden (280). Impedanzmessungen zeigen dabei eine Ausweitung des Extrazellulär-raums (284). Die Bedeutung dieses Mechanismus wird durch die Reduktion des Kälte-induzierten Hirnödems beim Kaninchen nach Gabe von Aprotinin (283), das die Kininfreisetzung verhindert, unterstrichen. Möglicherweise lassen sich solche Kininogenase-Inhibitoren oder auch Bradykinin-Antagonisten in Zukunft auch in der Klinik zur Therapie des Hirnödems einsetzen.

4.2.3.4. Der Effekt von Neurotensin an Hirngefäßen

4.2.3.4.1. Fehlen eines vasomotorischen Neurotensin-Effekts an Hirngefäßen der Katze

Neurotensin-immunoreaktive Nerven innervieren zahlreiche Gefäße verschiedener Spezies (97), so daß man von einem beinahe ubiquitären Phänomen sprechen kann. Eine solche Neurotensin-immunoreaktive Innervation ist auch für Hirngefäße von Rhesusaffe und Ratte nachgewiesen (49), wenn sie auch quantitativ weniger im Vordergrund steht. Andere Peptide wie vasoaktives intestinales Peptid (VIP), Peptid Histidin-Isoleucin (PHI), Neuropeptid Y, die in Gefäßnerven lokalisiert wurden, zeigen in situ deutliche vasomotorische Effekte (79, 80, 312, vgl. Tab. 4.9). Neurotensin wurde anfangs durch einen hypotensiven Effekt an Ratten bei i.v.-Gabe charakterisiert (41) und löst an einer Reihe von Strombahnen vasomotorische Effekte aus, z. B. Konstriktion im der Hinterextremität der Ratte (148), Kontraktion der Rattenpfortader (123, 234, 237) und Vermehrung des Blutflusses im Darm (122). Ein Teil der Effekte ist dabei jedoch indirekt (148, 236), größtenteils über Mastzelldegranulation.

Vor der vorliegenden Untersuchung lagen nur in-vitro-Ergebnisse zum Effekt von Neurotensin an Hirngefäßen vor (118); wie unter 4.2.3.1.1 am Beispiel Bradykinin diskutiert, zeigen Hirngefäße in vitro jedoch häufig variable oder von den Ergebnissen in situ abweichende Effekte. Es lag daher nahe, den Einfluß von Neurotensin auf den Gefäßdurchmesser von Hirnarterien der Katze bei Mikroapplikation in situ zu testen.

In der vorliegenden Untersuchung ließ sich kein Effekt von perivaskulär appliziertem Neurotensin auf den Gefäßdurchmesser in situ nachweisen. Da das gleiche Neurotensin an der Rattenpfortader und am Meerschweinchenileum die aus der Literatur bekannten Effekte zeite, ist ein methodischer Fehler, z. B. durch Abbau oder Adsorption des Neurotensins ausgeschlossen. In Anbetracht der sehr hohen benutzten Konzentrationen ist es auch nahezu ausgeschlossen, daß das Neurotensin vor Erreichen des Rezeptors vollständig abgebaut wurde. Es ist zwar im Gehirn neurotensinabbauende Aktivität vorhanden (54, 187), es konnten aber unter nahezu den gleichen experimentellen Bedingungen für eine Vielzahl von Peptiden, die von Peptidasen rasch abgebaut wurden, Effekte nachgewiesen werden (vgl. Tab. 4.9).

Das vorliegende Ergebnis steht in scheinbarem Widerspruch zu einer Untersuchung von Rioux et al. (235), die am perfundierten Rattenkopf bei Gabe von Neurotensin in die Arteria carotis Vasokonstriktion und Zunahme der Gefäßpermeabilität fanden. In dieser Untersuchung wurde das Neurotensin jedoch intravasal appliziert und es wurden Gefäßwiderstand und Ödembildung im gesamten Kopf, also an extra- und intrakraniellen Gefäßen gemessen, wobei nicht sicher unterschieden werden kann, welche Gefäße genau reagieren, so daß die Untersuchung weder von Applikationsart noch -ort her vergleichbar ist.

Gute Übereinstimmung besteht dagegen mit Resultaten von Hanko et al. (118), der an der isolierten A. cerebra media der Katze keinen Neurotensineffekt fand.

4.2.3.4.2. Mögliche Bedeutung der Neurotensin-immunoreaktiven Innervation

Nachdem Neurotensin-Immunoreaktivität in Nervenfasern, die Hirngefäße innervieren, nachgewiesen ist (49), stellt sich die Frage bezüglich ihrer Bedeutung. Es bestehen dabei mehrere, sich nicht ausschließende Denkmöglichkeiten:

-- Möglicherweise hat Neurotensin unter anderen experimentellen

Bedingungen einen Einfluß auf die Vasomotorik. So deuten die Ergebnisse von Rioux (235) auf einen Effekt bei intravasaler Applikation. Andererseits würde die perivaskulär liegende Innervation ein Effekt bei perivaskulärer Gabe bzw. Freisetzung nahelegen. Ein solcher könnte aber von Hirnregion zu Hirnregion oder von Spezies zu Spezies variieren. In dieser Hinsicht ist zu beachten, daß die Neurotensininnervation in bestimmten Hirnarealen wie z.B. der zentralen Medulla stärker ausgeprägt und am untersuchten frontoparietalen Cortex eher spärlich ist (49).

- Der Neurotensineffekt könnte nichtmotorischer Natur sein. Edvinsson (78) spricht die Möglichkeit einer sensiblen Funktion der Nerven an. Daneben könnte Neurotensin die Freisetzung oder den Effekt anderer Mediatoren verstärken oder vermindern. So ist Neurotensin eine potente Mastzellen degranulierende Substanz (37, 164) und Mastzellen sind im Perivasalraum der Hirngefäße reichlich vorhanden (167), so daß eine Beeinflussung der Mastzellen denkbar wäre.
- Zuletzt wäre es noch möglich, daß die Neurotensin-Immunoreaktivität nicht Neurotensin darstellt, sondern daß sich durch eine Kreuzreaktion ein anderes Effektorsystem zeigt und so das Problem "neurotensinhaltige Nervenfasern ohne Funktion" nicht besteht.

4.2.3.5. Die Bedeutung von Peptiden für die Regulation des Hirnkreislaufs

Wie aus Tabelle 4.9 hervorgeht, besitzt eine ganze Reihe von Peptiden vasomotorische Effekte am Hirnkreislauf. Für viele dieser Peptide ist dabei eine peptiderge Innervation der Hirngefäße nachgewiesen, so für Substanz P (49, 81), vasoaktives intestinales Peptid (VIP, 80), Peptid Histidin-Isoleucin (PHI, 80), Neuropeptid Y (79) und Neurotensin (49). Die Peptide sind dabei teilweise in denselben Fasern wie die "klassischen" Neurotransmitter Noradrenalin und Acetylcholin lokalisiert (78), wobei sie funktionell gleichartige Effekte zeigen; so ist das

vasodilatorische vasoaktive intestinale Peptid (VIP) ein Co-Transmitter von Acetylcholin, das vasokonstriktorische Neuropeptid Y von Noradrenalin (78). Die Effekte halten aber z. T. länger an (78) an, so daß möglicherweise eine Substanz dem "Soforteffekt" dient und die andere länger anhaltende Effekte vermittelt. Insgesamt dürfte der peptidergen Innervation angesichts der zahlreichen Anhaltspunkte für eine lokal-metabolische Regulation des Hirnkreislaufs (Übersichten 31, 160, 166, 300) und nach den z.Z. favorisierten Auffassungen jedoch eine eher modulatorische Rolle zukommen.

4.3. Abschließende Bemerkungen

4.3.1. Analogien von Bradykinin und Neurotensin

Nachdem in der vorliegenden Untersuchung mit Bradykinin und Neurotensin gearbeitet wurde, seien abschließend noch einmal einige Analogien verdeutlicht:

- Bradykinin (227) und Neurotensin (41) sind beide Oligopeptide mit zahlreichen basischen Aminosäuren.
- Bradykinin entsteht durch proteolytische Spaltung eines Proteins (eines der Kininogene, 195), für neurotensinähnliche Peptide wurde ein ähnlicher Mechanismus am Magen vermutet.
- Bradykinin und Neurotensin sind beide Substrate einer Reihe von Peptidasen wie Kininase II (Bradykinin (85), Neurotensin (262)), neutrale Endopeptidase (262), Kininase A und B (Bradykinin (34, 205), Neurotensin (32), Prolylendopeptidase (208)).
- Bradykinin (134, 138) und Neurotensin (164) können beide Mastzellen degranulieren und Histamin freisetzen.

- Ein Teil der Effekte von Bradykinin (199) und Neurotensin (234) werden über Prostaglandine vermittelt.
- Beide Peptide zeigen am Meerschweinchenileum einen verzögert einsetzenden kontrahierenden Effekt, der am vorkontrahierten Meerschweinchenileum biphasisch (Relaxation - Kontraktion) ist.

4.3.2. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen

Obwohl die vorliegenden Ergebnisse ausschließlich an Tieren gewonnen wurden, steht im Hintergrund immer die Frage der Übertragbarkeit auf den Menschen. Dafür spricht prinzipiell die biologische Ähnlichkeit von Mensch und Tier, dagegen die große Variabilität schon innerhalb des Tierreichs.

In dieser Untersuchung wurde gerade die große Variabilität der Ergebnisse in vitro am Beispiel der Pfortader herausgearbeitet. Es ist natürlich nicht vorherzusagen, inwieweit sich die menschliche Pfortader wie die der Ratte oder die des Meerschweinchens oder gar noch anders verhält.

Bei der Untersuchung in situ wurde mit der Katze ein Tier gewählt, das bezüglich des Hirnkreislaufs in vielen Eigenschaften dem Menschen ähnelt (119). Menschliche Hirngefäße reagieren in vitro ähnlich (301)

Für den Darm liegen Untersuchungen an Operationspräparaten vor, die einen motorischen Effekt von Bradykinin und Neurotensin demonstrieren (66, 91).

Letztendlich können nur Untersuchungen am Menschen selber sichere Aussagen über den Menschen bringen; solche Untersuchungen sind aber zur Zeit nicht oder nur schwer durchführbar oder ethisch nicht vertretbar. Man wird sich daher in der Praxis damit begnügen müssen, an Tieren Modelle zu entwickeln, und die

daraus abgeleiteten Folgerungen soweit möglich "stichpunktartig" am Menschen zu überprüfen."

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Effekt von Bradykinin und Neurotensin auf die Vasomotorik der Piaarterien der Katze in situ und der Effekt von Neurotensin auf die Meerschweinchenpfortader in vitro charakterisiert. Zur Herausarbeitung von Speziesunterschieden wurde neben der Meerschweinchenpfortader auch die Rattenpfortader in die Untersuchungen einbezogen. Das Meerschweinchenileum, an dem die Effekte von Bradykinin und Neurotensin bekannt sind, diente als Kontrollpräparation für Aktivitätsvergleiche. Ein Teil der Untersuchungen bezweckte, die Bedeutung der Kininase II für den Bradykinineffekt zu charakterisieren.

Bradykinin führt am Meerschweinchenileum zu konzentrationsabhängigen Kontraktionen mit einer EC_{50} von $2,59 \times 10^{-8} M$. Der Effekt setzt erst nach einer Latenzzeit ein, die mit zunehmender Konzentration abnimmt. Die erhaltene Dosis-Wirkungs-Kurve entspricht sehr gut der nach Clark für ein Ein-Mediator-Ein-Rezeptor-Modell angenommenen.

Unter den benutzten Bedingungen blieb die Sensitivität des Darms bezüglich Bradykinin während des Untersuchungszeitraums konstant. Frisch zubereitete und 5 h aufbewahrte Bradykininlösungen hatten die gleiche Aktivität.

Hemmstoffe der Kininase II führen am Meerschweinchenileum im gleichen Ausmaß sowohl bei Vorinkubation als auch bei simultaner Gabe mit Bradykinin zu einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve für Bradykinin. Das bedeutet, daß eine Potenzierung von Bradykinin bei simultaner Gabe eines Kininase II Hemmstoffs nachweisbar ist.

Neurotensin führt am rein mechanisch vorgedehnten Meerschweinchenileum zu einem biphasischen Effekt, bestehend aus einer kurzen Relaxation, der eine maximal ca. 10mal so starke Kontraktion folgt. Die Dauer der Relaxation nimmt mit zunehmender Konzentration ab.

Neurotensin führt an der Rattenpfortader in vitro konzentrationsabhängig zur Steigerung der Frequenz der Spontankontraktionen und zur Zunahme von Tonus und maximaler phasischer Kontraktion. An der Meerschweinchenpfortader hat Neurotensin dagegen keinen motorischen Effekt. Diese Ergebnisse zeigen, daß der Effekt von Neurotensin abhängig von der Tierspezies ist, und aus dem Vergleich mit den Resultaten am Ileum folgt, daß auch die Lokalisation der glatten Muskulatur einen wesentlichen Einfluß hat.

Perivaskuläre Mikroapplikation von Bradykinin erzeugt in situ eine konzentrationsabhängige reversible Dilatation der Piaarterien und -arteriolen der Katze. Der Effekt ist unabhängig vom Gefäßdurchmesser. Die EC_{50} beträgt $4,4 \times 10^{-7}$; der Maximaleffekt ist mit 45 % größer als der mit zahlreichen anderen Substanzen ausgelöste. Infolge der potenten dilatatorischen Wirkung und der in der Literatur beschriebenen permeabilitätssteigernden Wirkung kann Bradykinin, das sich nach Hirntrauma im Hirngewebe nachweisen läßt, als ein Mediator des sekundären Hirnschadens angesehen werden.

Hemmstoffe der Kininase II (Captopril, Potentiator C) haben keinen Einfluß auf die Dosis-Wirkungs-Kurve von Bradykinin an Hirngefäßen. Da die Versuche am Meerschweinchen-Ileum gezeigt haben, daß auch bei simultaner Gabe von Bradykinin und Kininase II Hemmstoff eine Potenzierung nachweisbar ist, wird gefolgert, daß Kininase II für den Abbau von perivaskulär wirkendem Bradykinin offenbar nicht von Bedeutung ist.

Neurotensin ist bei perivaskulärer Mikroapplikation ohne Einfluß auf den Durchmesser von Piaarterien der Katze und hat somit offensichtlich keine Bedeutung für die zerebrovaskuläre Widerstandsregulation.

LITERATUR

1. Aarsen, P. N.
Sensitization of guinea-pig ileum to the action of bradykinin by trypsin hydrolysate of ox and rabbit plasma
Brit. J. Pharmacol. Chemother. 32, 453 - 465 (1968)
2. Abelous, J. E., Bardier, E.
Les substances hypotensives de l'urine humaine normale
C. R. Seances Soc. Biol. 66, 511 (1909)
3. Al-Saffar, A., Rosell, S.
Effects of neurotensin and neurotensin analogues on the migrating myoelectric complexes in the small intestine of rats
Acta Physiol. Scand. 112, 203 - 208 (1981)
4. Allen, G. S., Henderson, L. M., Chou, S. N., French, L. A.
Cerebral arterial spasm. Part 1: In vitro contractile activity of vasoactive agents on canine basilar and middle cerebral arteries
J. Neurosurg. 40, 433 - 441 (1974)
5. Allen, G. S., Gross, G. J., French, L. A., Chou, S. N.
Cerebral arterial spasm, Part 5: In vitro contractile activity of vasoactive agents including human CSF on human basilar and anterior cerebral arteries
J. Neurosurg. 44, 594 - 600 (1976)
6. Almenoff, J., Wilk, S., Orlowski, M.
Membrane bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase
Biochem. Biophys. Res. Commun. 102, 206 - 214 (1981)

7. Araki, K., Tachibana, S., Uchijama, M., Nakajima, T., Yasuhara, T.
Isolation and structure of a new active peptide, "Xenopsin" on
the muscle, especially on a strip of fundus from a rat stomach,
from the skin of *xenopus laevis*
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 21, 2801 - 2804 (1973)
8. Arregui, A., Benett, J. P., Bird, E. D., Yamamura, H. I., Iversen, L. L.,
Snyder, S. H.
Huntington's chorea: selective depletion of activity of angiotensin
converting enzyme in the corpus striatum
Ann. Neurol. 2, 294 - 298 (1977)
9. Arregui, A., Emson, P. C., Spokes, E. G.
Angiotensin-converting enzyme in substantia nigra: reduction of activity in
Huntington's disease and after intrastriatal kainic acid in rats
Europ. J. Pharmacol. 52, 121 - 124 (1978)
10. Auer, L. M., Leber, K., Suyama, I.
Effect of serotonin and its antagonist ketanserin on pial
vessels
J. Cereb. Blood Flow Metab. 5, 517 - 522 (1985)
11. Bakhle, Y. S.
Conversion of angiotensin I to angiotensin II by cell-free extracts of dog
lung
Nature 220, 919 - 921 (1968)
12. Bardon, T., Ruckebusch, I.
Neurotensin-induced colonic motor responses in dogs: a mediation by
prostaglandins
Regul. Pept. 10, 107 - 114 (1985)
13. Barlas, A., Sugio, K., Greenbaum, L. M.
Release of T-kinin and bradykinin in carrageenin induced inflammation in
the rat
FEBS Letters 190, 268 - 270 (1985)

14. Bennett, A.
The pharmacology of isolated gastrointestinal muscle
in *Pharmacology of gastrointestinal motility and secretion*,
Pergamon Oxford 399 - 432 (1973)
15. Bennett, A., Eley, K. G., Stockley, H. L.
Modulation by prostaglandins of contractions in guinea-pig ileum
Prostaglandins 9, 377 - 384 (1975)
16. Bertaccini, G.
Locally active peptides ("vasoactive peptides")
in *Mediators and drugs in gastrointestinal motility II*, G. Bertaccini
(ed.), *Hdb. Exp. Pharmacol.* 56/II, 175 - 200 (1982)
17. Bertaccini, G.
Candidate hormones
in *Mediators and drugs in gastrointestinal motility II*, G. Bertaccini
(ed.), *Hdb. Exp. Pharmacol.* 56/II, 85 - 136 (1982)
18. Bhatnagar, Y. M., Carraway, R.
Bacterial peptides with C-terminal similarities to bovine neurotensin
Peptides 2, 51 - 59 (1981)
19. Bhoola, K., Lemon, M., Matthews, R.
Kallikrein in exocrine glands
in *Bradykinin, kallidin and kallikrein*, E. G. Erdös (ed.),
Hdb. Exp. Pharmacol. XXV suppl. Springer New York 489 - 523 (1979)
20. Boersma, F. J., DeJonge, J. J., Stellwagen W. R.
A power comparison of the F- and L-Tests
Psycholog. Rev. 71, 505 - 513 (1964)
21. Bonta, I. L., Hall, D. W. R.
Potentiation of the biphasic bradykinin response of the guinea-pig ileum
Brit. J. Pharmacol. 49, 1618 - 1628 (1973)

22. Bortoff, A.
Myogenic control of intestinal motility
Phys. Rev. 56, 418 - 434 (1976)
23. Brecher, P., Tercyat, A., Gavras, H., Chobanian, A. V.
Peptidyl dipeptidase in rabbit brain microvessels
Biochem. Biophys. Acta 526, 537 - 546 (1978)
24. Brown, D. R., Miller, R. J.
Neurotensin
Brit. Med. Bull. 38, 239 - 245 (1982)
25. Brown, D. R., Miller, R. J.
Substance P and neurotensin: actions in the gastrointestinal tract
Ann. Rep. Medicinal Chemistry 17, 271 - 280 (1982)
26. Brownlee, G., Harry, J.
Some pharmacological properties of the circular and longitudinal muscle strips from the guinea-pig isolated ileum
Brit. J. Pharmacol. 21, 544 - 554
27. Bueno, L., Fioramonti, J., Fargeas, M. J., Primi, M. P.
Neurotensin: a central neuromodulator of gastrointestinal mobility in the dog
Am. J. Physiol. 248, G 15 - 19 (1985)
28. Burnstock, G., Crowe, R., Wong, H. K.
Comparative pharmacological and histochemical evidence for purinergic inhibitory innervation of the portal vein of the rabbit, but not guinea-pig
Brit. J. Pharmacol. 65, 377 - 388 (1979)
29. Burt, D. R.
Other peptide receptors
in Enna, S. J., Yamamura, H. J. (eds.), Neurotransmitter receptors, Part 1, Amino acids, peptides and benzodiazepines, Chapman and Hall, London 1980, S. 148 - 205

30. Bury, R. W., Mashbord, M. C.
A pharmacological investigation of synthetic substance P on the isolated guinea-pig ileum
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 4, 453 - 461 (1977)
31. Busija, D. W., Heistad, D. D.
Factors involved in the physiological regulation of the cerebral circulation
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 101, 161 - 211 (1984)
32. Camargo, A. C. M., Caldo, H., Enson, P. C.
Degradation of neurotensin by rabbit brain endo-oligopeptidase A and endo-oligopeptidase B (proline-endopeptidase)
Bioch. Biophys. Res. Commun. 116, 1151 - 1159 (1983)
33. Camargo, A. C. M., Caldo, H., Reis, M. L.
Susceptibility of a peptide derived from bradykinin to hydrolysis by brain endo-oligopeptidases and pancreatic proteinases
J. Biol. Chem. 254, 5304 - 5307 (1979)
34. Camargo, A. C. M., Shapanka, R., Greene, L. J.
Preparation, assay, and partial characterization of a neutral endopeptidase from rabbit brain
Biochem. 12, 1838 - 1844 (1973)
35. Carraway, R. E.
Rapid proteolytic generation of neurotensin-related peptide(s) and biologic activity during extraction of rat and chicken gastric tissues
J. Biol. Chem. 259, 10328 - 10334 (1984)
36. Carraway, R., Bhatnagar, Y. M.
Isolation, structure and biologic activity of chicken intestinal neurotensin
Peptides 1, 167 - 174 (1980)

37. Carraway, R. E., Cochrane, D. E., Granier, C., Kitabgi, P., Leeman, E., Singer, E. A.
Parallel secretion of endogenous 5-hydroxytryptamine and histamine from mast cells stimulated by vasoactive peptides and compound 48/80
Brit. J. Pharmacol. 81, 227 - 229 (1984)
38. Carraway, R. E., Ferris, C. F.
Isolation, biological and chemical characterization, and synthesis of a neurotensin-related hexapeptide from chicken intestine
J. Biol. Chem. 258, 2475 - 2479 (1983)
39. Carraway, R. E., Feurle, G. E.
Generation of Xenopsin-related peptides during acid extraction of gastric tissues
J. Biol. Chem. 260, 10921 - 10925 (1985)
40. Carraway, R., Kitabgi, P., Leeman, S. E.
The amino acid sequence of radioimmunoassayable neurotensin from bovine intestine, identity to neurotensin from hypothalamus
J. Biol. Chem. 253, 7996 - 7998 (1978)
41. Carraway, R., Leeman, S. E.
The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalamus
J. Biol. Chem. 248, 6854 - 6861 (1973)
42. Carraway, R., Leeman, S. E.
The synthesis of neurotensin
J. Biol. Chem. 250, 1912 - 1918 (1975)
43. Carraway, R., Leeman, S. E.
The amino acid sequence of a hypothalamic peptide, neurotensin
J. Biol. Chem. 250, 1907 - 1911 (1975)
44. Carraway, R., Leeman, S. E.
Characterization of radioimmunoassayable neurotensin in the rat
J. Biol. Chem. 251, 7045 - 7052 (1976)

45. Carraway, R., Ruane, S. E., Kim, H.-R.
Distribution and immunochemical character of neurotensin-like material in representative vertebrates and invertebrates: apparent conservation of the COOH-terminal region during evolution
Peptides 1, 115 - 123 (1982)
46. Carretero, O. A., Scicli, A. G.
The renal kallikrein-kinin system
Am. J. Physiol. 238, F247 - F255 (1980)
47. Carruba, M., Mandelli, V., Mantegazza, P.
The effect of angiotensin II and other vasoactive drugs on the isolated portal vein preparations
Arch. int. Pharmacodyn. 201, 224 - 233 (1973)
48. Cavalli-Sforza, L.
Biometrie
G. Fischer, Stuttgart, 4. Auflage (1974)
49. Chan-Palay, V.
Innervation of cerebral blood vessels by norepinephrine, indoleamine, substance P and neurotensin fibers and the leptomeningeal indoleamine axons: their roles in vasomotor activity and local alterations of brain blood composition
in Neurogenic control of the brain circulation, C. Owman, L. Edvinsson (eds.), Pergamon Press, Stockholm 39 - 53 (1977)
50. Chand, N., Altura, B. M.
Inhibition of endothelial cell-dependent relaxations to acetylcholine and bradykinin by lipoxigenase inhibitors in canine isolated renal arteries
Microcirculation 1, 211 - 223 (1981)
51. Chao, J., Woodley, C., Chao, L., Margolius, H. S.
Identification of tissue kallikrein in brain and in the cell-free translation product encoded by brain mRNA
J. Biol. Chem. 258, 15173 - 15178 (1983)

52. Chase, A., Volicer, L.
Bradykinin receptors in isolated intestinal smooth muscle
Drug Development Res. 2, 1 - 16 (1982)
53. Checler, F., Labbe, C., Granier, C., van Rietschoten, J., Kitabgi, P., Vincent, J.-P.
(Trp¹¹)-neurotensin and xenopsin discriminate between rat and guinea-pig neurotensin receptors
Life Sci. 31, 1145 - 1150 (1982)
54. Checler, F., Vincent, J.-P., Kitabgi, P.
Neurotensin analogs (D-Tyr¹¹) and (D-Phe¹¹) neurotensin resist degradation by brain peptidases in vitro and in vivo
J. Pharmacol. Exp. Ther. 227, 743 - 748 (1983)
55. Cherry, P. D., Furchgott, R. F., Zawadzki, J. V., Jothianandan, D.
Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2106 - 2110 (1982)
56. Chiba, S., Quilley, C. P., Quilley, J., McGiff, J. C.
Captopril decreases vascular reactivity independently of changes in converting enzyme activity and prostaglandin release in the rat isolated kidney
Europ. J. Pharmacol. 83, 243 - 252 (1982)
57. Clark, W. G.
Kinins and the peripheral and central nervous system
in Bradykinin, kallidin and kallikrein, E. G. Erdös (ed.),
Hdb. Exp. Pharmacol. XXV suppl., Springer, New York, 311 - 356 (1979)
58. Cocks, T., Burnstock, G.
Effects of neuronal polypeptides on intestinal smooth muscle; a comparison with non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation and ATP
Europ. J. Pharmacol. 54, 251 - 259 (1979)

59. Cohen, M. L.
Synthetic and fermentation-derived angiotensin-converting enzyme inhibitors
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 25, 307 - 323 (1985)
60. Collier, H. O. J.
Bronchoconstrictor action of bradykinin, kallidin, and eledoisin (reply)
Nature 205, 403 - 404
61. Colman, R. W., Wong, P. Y.
Kallikrein-kinin system in pathologic conditions
in Erdös, E. G. (ed.), *Bradykinin, kallidin and kallikrein*,
Hdb. Exp. Pharmacol. XXV Suppl., 569 - 608, Springer Berlin 1979
62. Colquhoun, D., Tattersall, M. L.
Rapid histamine assays: a method and some theoretical considerations
Brit. J. Pharmacol. 38, 241 - 252 (1970)
63. Cooper, P. E., Martin, J. B.
Centrally acting peptides and cerebral circulation
in *Cerebral Circulation and Neurotransmitters*, A. Bes, G. Geraud (eds.)
Excerpta medica, Amsterdam Oxford Princeton, 247-253 (1980)
64. Correa, F. M. A., Innis, R. B., Uhl, G. R., Snyder, S. H.
Bradykinin-like immunoreactive neuronal systems localized histochemically in rat brain
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 1489 - 1493 (1979)
65. Correa, F. M. A., Plunkett, L. M., Saavedra, J. M.
Quantitative distribution of angiotensin-converting enzyme (kininase II) in discrete areas of the rat brain by autoradiography with computerized microdensitometry
Brain Res. 375, 259 - 266 (1986)
66. Couture, R., Mizrahi, J., Regoli, D., Devroede, G.
Peptides and the human colon: an in vitro pharmacological study
Can. J. Physiol. Pharmacol. 59, 957 - 966 (1981)

67. Curry, S. H., Brown, E. A., Kuck, H., Cassin, S.
Preparation and stability of indomethacin solutions
Can. J. Physiol. Pharmacol. 60, 988 - 992 (1982)
68. Cushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F., Ondetti, M. A.
Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme
carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids
Biochem. 16, 5484 - 5491 (1977)
69. Cushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F., Rubin, B., Ondetti, M. A.
Development of specific inhibitors of angiotensin I converting enzyme
(kininase II)
Fed. Proc. 38, 2778 - 2782 (1979)
70. Cushman, D. W., Ondetti, M. A.
Inhibitors of angiotensin-converting enzyme for treatment of hypertension
Biochem. Pharmacol. 29, 1871 - 1877 (1980)
71. Cushman, D. W., Ondetti, M. A.
Control of blood pressure by angiotensin blockade
Trends in Pharmacol. Sci. 1, 260 - 263 (1980)
72. Day, M., Vane, J. R.
An analysis of the direct and indirect actions of drugs on the isolated
guinea-pig ileum
Brit. J. Pharmacol. 20, 150 - 170 (1963)
73. Drouin, J. N., St-Pierre, S. A., Regoli, D.
Receptors for bradykinin and kallidin
Can. J. Physiol. Pharmacol. 57, 375 - 379 (1979)
74. Edery, H.
Potentiation of the action of bradykinin on smooth muscle by chymotrypsin,
chymotrypsinogen and trypsin
Brit. J. Pharmacol. 22, 371 - 379 (1964)

75. Edery, H.
Further studies of the sensitization of smooth muscle to the action of plasma kinins by proteolytic enzymes
Brit. J. Pharmacol. 24, 485 - 496 (1965)
76. Edery, H.
Sensitization of smooth muscle cells to the action of plasma kinins by chymotrypsin
in Hypotensive Peptides, E. G. Erdös, N. Back, F. Sicuteri (ed.),
A. F. Wilde (eds.), Springer Berlin Heidelberg New York 341 - 343 (1966)
77. Edery, H., Stemeck, M.
Release of prostaglandins mediating the potentiation of bradykinin by BPF and chymotrypsin in rat isolated ileum
Agents and actions 8, 159 - 160 (1978)
78. Edvinsson, L.
Functional role of perivascular peptides in the control of cerebral circulation
Trends in Neurosci. 8, 126 - 131 (1985)
79. Edvinsson, L., Emson, P., McCulloch, J., Tatemoto, K., Uddman, R.
Neuropeptide Y: Immunocytochemical localization to and effect upon feline pial arteries and veins in vitro and in situ
Acta Physiol. Scand. 122, 155 - 163 (1984)
80. Edvinsson, L., McCulloch, J.
Distribution and vasomotor effects of peptide HI (PHI) in feline cerebral blood vessels in vitro and in situ
Regul. Pept. 10, 345 - 356 (1985)
81. Edvinsson, L., McCulloch, J., Uddman, R.
Substance P: Immunohistochemical localization and effect upon cat pial arteries in vitro and in situ
J. Physiol. 318, 251 - 258 (1981)

82. Elliot, D. F.

The discovery and characterization of bradykinin
in Bradykinin, kallidin and kallikrein, E. G. Erdös (ed.),
Hdb. Exp. Pharmacol. XXV, 7 - 13 (1970)

83. Ellis, E. F., Wei, E. P., Kontos, H. A.

Vasodilation of cat cerebral arterioles by prostaglandins D_2 , E_2 , G_2 and
 I_2
Am. J. Physiol. 237, H381 - H385 (1979)

84. Erdös, E. G.

Inhibitors of kininases
Fed. Proc. 38, 2774 - 2777 (1979)

85. Erdös, E. G.

Kininases
in Bradykinin, kallidin and kallikrein, E. G. Erdös (ed.),
Hdb. Exp. Pharmacol. XXV suppl., Springer, New York, 428 - 488 (1979)

86. Ferreira, S. H.

A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of bothrops
jararaca
Brit. J. Pharmacol. 24, 163 - 169 (1965)

87. Ferreira, S. H., Rocha e Silva, M.

Potentialiation of bradykinin by dimercaptopropanol (BAL) and other
inhibitors of its destroying enzyme in plasma
Biochem. Pharmacol. 11, 1123 - 1128 (1962)

88. Ferris, C. F., Carraway, R. E., Hammer, R. A., Leeman, S. E.

Release and degradation of neurotensin during perfusion of rat small
intestine with lipid
Regul. Pept. 12, 101 - 111 (1985)

89. Feurle, G. E.
Physiological and pathological aspects of a neuroendocrinological principle:
neurotensin
Front. Horm. Res. 12, 157 - 167 (1984)
90. Feurle, G. E., Müller, B., Ohnheiser, G., Baca, I.
Action of neurotensin on size, composition, and growth of pancreas and
stomach in the rat
Regul. Pept. 13, 53 - 62 (1985)
91. Fishlock, D. J.
Effect of bradykinin on the human isolated small and large intestine
Nature 212, 1533 - 1535 (1966)
92. Fletcher, D. R., Shulkes, A., Hardy, K. J.,
The effect of neurotensin and secretin on gastric acid secretion and mucosal
blood flow in man
Regul. Pept. 11, 217 - 226 (1985)
93. Frey, E. K., Kraut, H.
Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 133, 1-56 (1928)
94. Furchgott, R. F., Cherry, P. D., Zawadzki, J. V., Jothiandan, D.
Endothelial cells as mediators of vasodilatation of arteries
J. Cardiovasc. Pharmacol. 6, Suppl. 2, S336 - S343 (1984)
95. Fuxe, K., Ganten, D., Köhler, C., Schüll, B., Speck, G.
Evidence for differential localization of angiotensin-I-converting enzyme and
and renin in the corpus striatum of rat
Acta Physiol. Scand. 110, 321 - 323 (1980)
96. Ganong, W. F.
The brain renin-angiotensin system
Ann. Rev. Physiol. 46, 17 - 31 (1984)

97. Gascon, A. C.
Inhibition of eledoisin by morin on the isolated guinea pig ileum
Can. J. Physiol. Pharmacol. 46, 67 - 69 (1968)
98. Gee, N. S., Matsas, R., Kenny, A. J.
A monoclonal antibody to kidney endopeptidase-24.11
Biochem. J. 214, 377 - 386 (1983)
99. Gershon, M. D.
Effects of tetrodotoxin on innervated smooth muscle preparations
Brit. J. Pharmacol. 29, 259 - 279 (1967)
100. Gimbrone, M. A., Majeau, G. R., Atkinson, W. J., Sadler, W., Cruise, S. A.
Angiotensin-converting enzyme activity in isolated brain microvessels
Life Sci. 25, 1075 - 1084 (1979)
101. Gjuris, V., Westernmann, E.
Bronchoconstrictor action of bradykinin, kallidin, and eledoisin
Nature 205, 402 - 403 (1965)
102. Gladner, J. A., Murtaugh, P. A., Folk, J. E., Laki, K.
Nature of peptides released by thrombin
Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 47 - 52 (1963)
103. Goedert, M., Hunter, J. C., Ninkovic, M.
Evidence for neurotensin as a non-adrenergic, non-cholinergic
neurotransmitter in guinea pig ileum
Nature 311, 59 - 62 (1984)
104. Goedert, M., Sturme, N., Williams, B. J., Emson, P. C.
The comparative distribution of xenopsin- and neurotensin-like
immunoreactivity in *Xenopus laevis* and rat tissues
Brain Res. 308, 273 - 280 (1984)

105. Goldstein, D. J., Ropchak, T. G., Keiser, H. R., Atta, G. J., Argiolas, A., Pisano, J. J.
Bradykinin reverses the effect of opiates in the gut by enhancing acetylcholine release
J. Biol. Chem. 258, 12122 - 12124 (1983)
106. Goldstein, R. H., Wall, M.
Activation of protein formation and cell division by bradykinin and Des-Arg⁹-bradykinin
J. Biol. Chem. 259, 9263 - 9268 (1984)
107. Greenbaum, L. M.
Kinogenases of blood cells (alternate kinin generating system)
in Bradykinin, kallidin and kallikrein, E. G. Erdös (ed.),
Hdb. Exp. Pharmacol. XXV suppl., Springer, New York, 91 - 102 (1979)
108. Greenbaum, L. M.
T-kinin and T-kininogen - children of new technology
Biochem. Pharmacol. 33, 2943 - 2944 (1984)
109. Greenbaum, L. M., Yamafuji, K., Hosoda, T.
Studies of the peptic degradation of bovine bradykininogen
Bioch. Pharmacol. 14, 411 - 420 (1965)
110. Greenberg, R., O'Keefe, E. H., Antonaccio, M. J.
The effect of captopril and ascorbic acid on nonenzymatic methionine enkephalin inactivation in the guinea-pig ileum
J. Pharmacol. Exp. Ther. 217, 750 - 756 (1981)
111. Grega, G. J., Svensjö, E., Haddy, F. J.
Macromolecular permeability of the microvascular membrane:
Physiological and pharmacological regulation
Microcirc. 1, 325 - 341 (1981)

112. Håkanson, R., Sundler, F.
The design of the neuroendocrine system: a unifying concept and its consequences
Trends in Pharm. Sci. 4, 41 - 45 (1983)
113. Hall, D. W. R., Bonta, I. L.
The biphasic response of the isolated guinea-pig ileum by bradykinin
Europ. J. Pharmacol. 21, 147-154 (1973)
114. Hall, D. W. R., Bonta, I. L.
Effects of adrenergic blockers on the relaxation of the guinea-pig ileum by bradykinin and adrenaline
Europ. J. Pharmacol. 21, 139 - 146 (1973)
115. Hamel, E., Edvinsson, L., MacKenzie, E. T.
Reactivity of various cerebral arteries to vasoactive substances in different mammalian species
J. Cereb. Blood Flow Metab. 5 Suppl. 1, S553 - S554 (1985)
116. Hammer, R. A., Leeman, S. E., Carraway, R., Williams, R. H.
Isolation of human intestinal neurotensin
J. Biol. Chem. 255, 2476 - 2480 (1980)
117. Handschumacher, R. E., Vane, J. R.
The relationship between the penetration of tryptamine and 5-hydroxytryptamine into smooth muscle and the associated contractions
Brit. J. Pharmacol. Chemother. 29, 105 - 118 (1967)
118. Hanko, J., Hardebo, J. E., Owman, C.
Effects of various neuropeptides on cerebral blood vessels in Cerebral blood flow: effects of nerves and neurotransmitters
D. D. Heistad, M. L. Marcus (eds.), Elsevier, New York 227 - 234 (1982)

119. Hardebo, J. E., Hanko, J.
Species variations in the cerebrovascular response to neurotransmitters
and related vasoactive compounds
in Cerebral blood flow: effects of nerves and neurotransmitters,
D. D. Heistad, M. L. Marcus (eds.), Elsevier, New York, 223 - 225 (1982)
120. Hardebo, J. E., Hanko, J., Kahrström, J., Öwman, C. (1985)
Endothelium-dependent relaxation in cerebral arteries
J. Cereb. Blood Flow Metabol. 5 Suppl. 1, S533 - S534 (1985)
121. Harper, A. M., MacKenzie, E. T.
Effects of 5-hydroxytryptamine on pial arteriolar calibre in anaesthetized
cats
J. Physiol. 271, 735 - 746 (1977)
122. Harper, S. L., Barrowman, J. A., Kvietys, P. R., Granger, D. N.
Effect of neurotensin on intestinal capillary permeability and blood flow
Am. J. Physiol. 247, G 161 - 166 (1984)
123. Helle, K. B., Serck-Hanssen, G., Jorgensen, G., Knudsen, R.
Neurotensin-induced contractions in venous smooth muscle
J. Auton. Nerv. Syst. 2, 143 - 155 (1980)
124. Herbert, D. A., Mitchell, R. A.
Blood gas tensions and acid-base balance in awake cats
J. Appl. Physiol. 30, 434 - 436 (1971)
125. Hernandez, D. E., Richardson, C. M., Nemeroff, C. B., Orlando, R. C.,
St-Pierre, S., Rioux, F., Prange, A. J.
Evidence for biological activity of two N-terminal fragments of neurotensin,
neurotensin 1 - 8 and neurotensin 1 - 10
Brain Res. 301, 153 - 156 (1984)
126. Hernandez, D. E., Simone, K. B., Spampinato, D., Rioux, F., St-Pierre, S.
Pupillary effects of neurotensin: structure-activity relationships
Neuropeptides 6, 561 - 568 (1985)

127. Hirst, G. D. S., Holman, M. E., Spence, I.
Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig
J. Physiol. 236, 303 - 326 (1974)
128. Holm, S.
A simple sequentially multiple test procedure
Scand. J. Statist. 6, 65 - 70 (1979)
129. Holzer, P., Bussics, A., Saria, A., Lembeck, F.
A study of the concentrations of substance P and neurotensin in the gastrointestinal tract of various mammals
Neuroscience 7, 2919 - 2924 (1982)
130. Hori, S.
The presence of bradykinin-like polypeptides, kinin-releasing and destroying activity in brain
Jap. J. Physiol. 18, 772 - 787 (1968)
131. Hugues, M., Schmid, H., Ramey, G., Duval, D., Frelin, C., Lazdunski, M.
The Ca^{2+} -dependent slow K^{+} conductance in cultured rat muscle cells: characterization with apamin
EMBO J. 1, 1039 - 1042 (1982)
132. Huidobro-Toro, J. P., Zhu, Y.-X.
Neurotensin receptors on the ileum of the guinea-pig: evidence for the coexistence of inhibitory and excitatory receptors
Europ. J. Pharmacol. 102, 237 - 250 (1984)
133. Huidobro-Toro, J. P., Zhu, Y.-X., Lee, N. M., Loh, H. H., Way, E. L.
Dynorphin inhibition of the neurotensin contractile activity on the myenteric plexus
J. Pharmacol. Exp. Ther. 228, 293 - 303 (1984)

134. Ishizaka, T., Iwata, M., Ishizaka, K.
Release of histamine and arachidonate from mouse mast cells induced by glykosylation-enhancing factor and bradykinin
J. Immunol. 134, 1880 - 1887 (1985)
135. Iso, T., Nishimura, K., Oya, M., Iwao, J.-I.
Potentiating mechanism of bradykinin action on smooth muscle by sulfhydryl compounds
J. Immunol. 134, 1880 - 1887 (1985)
136. Jandhyala, B. S., Kjellstedt, A., Ljung, B.
Does captopril lower arterial blood pressure due to inhibition of the angiotensin I converting enzyme? Experimental studies in vivo and in vitro
Drugs Exptl. Clin. Res. 6, 557 - 567 (1980)
137. Johnson, A. R.
Effects of kinins on organ systems
in *Bradykinin, kallidin and kallikrein*, E. G. Erdös (ed.),
Hdb. Exp. Pharmacol. XXV suppl., Springer, New York, 357 - 400 (1979)
138. Johnson, A. R., Erdös, E. G.
Release of histamine from mast cells by vasoactive peptides
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142, 1252 - 1256 (1973)
139. Kalivas, P. W., Richardsen, R., Duffy, P.
Neuromedin N mimics the action of neurotensin in the ventral tegmental area but not in the nucleus accumbens
J. Pharmacol. Exp. Therap. 238, 1126 - 1131 (1986)
140. Kamitani, T., Little, M. H., Ellis E.F.
Effect of leucotrienes, 12-HETE, histamine, bradykinin, and 5-hydroxytryptamine on in vivo rabbit cerebral arteriolar diameter
J. Cereb. Blood Flow Metab. 5, 554 - 559 (1985)

141. Kamitani, T., Little, M. H., Ellis, E. F.
Evidence for a possible role of the brain kallikrein-kinin system in the modulation of the cerebral circulation
Circ. Res. 57, 545 - 552 (1985)
142. Kariya, K., Iwaki, H., Ihda, M., Murase, M.
Central action of bradykinin (I): Electroencephalogram of bradykinin and its degradation system in rat brain
Jpn. J. Pharmacol. 31, 261 - 267 (1981)
143. Kariya, K., Kawauchi, R., Okamoto, H.
Regional distribution of kininase in rat brain
J. Neurochem. 36, 2086 - 2088 (1981)
144. Kariya, K., Okamoto, H., Kira, K.
Kinin-forming enzyme in rat brain mitochondria fraction and biological activity of a kinin released from rat plasma kininogen by this enzyme
Japan. J. Pharmacol. 34, 203 - 210 (1984)
145. Kariya, K., Yamauchi, A., Hattori, S., Tsuda, Y., Okada, Y.
The disappearance rate of intraventricular bradykinin in the brain of the conscious rat
Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 1461 - 1466 (1982)
146. Katusic, Z. S., Shepherd, J. T., Vanhoutte, P. M.
Oxytocin causes endothelium-dependent relaxations of canine basilar arteries by activating V1-vasopressinergic receptors
J. Pharmacol. Exp. Ther. 236, 166 - 170 (1986)
147. Kenakin, T. P.
The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues
Pharmacol. Rev. 36, 165 - 211 (1984)
148. Kerouac, R., St-Pierre, S., Rioux, F.
Participation of mast cell 5-hydroxytryptamine in the vasoconstrictor effect of neurotensin in the rat perfused hindquarter
Life Sci. 34, 947 - 959 (1984)

149. Khairallah, P. A., Page, I. H.
Mechanism of action of angiotensin and bradykinin on smooth muscle in situ
Am. J. Physiol. 200, 51 - 54 (1961)
150. Khairallah, P. A., Page, I. H.
Effects of bradykinin and angiotensin on smooth muscle
Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 212 - 221 (1963)
151. Kitabgi, P., Carraway, R., Leeman, S. E.
Isolation of a tridecapeptide from bovine intestinal tissue and its
partial characterization as neurotensin
J. Biol. Chem. 251, 7053 - 7058 (1976)
152. Kitabgi, P., Checler, F., Vincent, J. P.
Comparison of some biological properties of neurotensin and its natural
analogue [ANT-6
Eur. J. Pharmacol. 99, 357 - 360 (1984)
153. Kitabgi, P., Freychet, P.
Effects of neurotensin on isolated intestinal smooth muscles
Europ. J. Pharmacol. 50, 349 - 357 (1978)
154. Kitabgi, P., Freychet, P.
Neurotensin: contractile activity, specific binding, and lack of effect
on cyclic nucleotides in intestinal smooth muscle
Europ. J. Pharmacol. 55, 35 - 42 (1979)
155. Kitabgi, P., Freychet, P.
Neurotensin contracts the guinea-pig longitudinal ileal smooth muscle by
inducing acetylcholine release
Europ. J. Pharmacol. 56, 403 - 406 (1979)
156. Kitabgi, P., Poustis, C., Granier, C., van Rietschoten, J., Rivier, J.,
Morgat, J.-L., Freychet, P.
Neurotensin binding to extraneural and neural receptors: comparison with
biological activity and structure-activity relationships
Molecul. Pharmacol. 18, 11 - 19 (1980)

157. Kitamura, N., Kitagawa, H. Fukushima, D., Takagaki, Y., Miyata, T.,
Nakanishi, S.
Structural organization of the human kininogen gene and a model for its
evolution
J. Biol. Chem. 260, 8610 - 8617 (1985)
158. Knisatschek, H., Bauer, K.
Characterization of "thyrolyberin-deamidating enzyme" as a post-proline-
cleaving enzyme
J. Biol. Chem. 254, 10936 - 10943 (1979)
159. Kobayashi, M., Chata, K
Comparison of kinins derived from rat stomach tissue and produced by
catheptic enzyme in rat stomach
Japan. J. Pharmacol. 36, 169 - 175 (1984)
160. Kontos, H. A.
Regulation of the cerebral circulation
Ann. Rev. Physiol. 43, 397 - 407 (1981)
161. Kontos, H.A., Wei, E. P., Povlishock, J. T., Christman, C. W.
Oxygen radicals mediate the cerebral arteriolar dilatation from
arachidonate and bradykinin in cats
Circ. Res. 55, 295 - 303 (1984)
162. Kosterlitz, H. W., Lydon, R. J., Watt, A. J.
The effects of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on inhibitory α -
and β -adrenoceptors in the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum
Brit. J. Pharmacol. 39, 398 - 413 (1970)
163. Krebs, H. A., Henseleit, K.
Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper
Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. physiol. Chemie 210, 33 - 66 (1932)
164. Kurose, M., Saeki, K.
Histamine release induced by neurotensin from rat peritoneal mast cells
Europ. J. Pharmacol. 76, 129 - 136 (1981)

165. Kuschinsky, W., Wahl, M.
Interactions between perivascular norepinephrine and potassium or osmolarity
on pial arteries of cats
Microvascular Res. 14, 173 - 180 (1977)

166. Kuschinsky, W., Wahl, M.
Local chemical and neurogenic regulation of cerebral vascular
resistance
Phys. Rev. 58, 656 - 689 (1978)

167. Kuschinsky, W., Wahl, M.
Effect of histamine on pial arteries: a microapplication study
Adv. Neurol. 20, 65 - 69 (1978)

168. Kuschinsky, W., Wahl, M.
Perivascular pH and pial arterial diameter during bicuculline
induced seizures in cats
Pflügers Arch. 382, 81 - 85 (1979)

169. Kuschinsky, W., Wahl, M., Bosse, O., Thurau, K.
Perivascular potassium and pH as determinants of local pial arterial
diameter in cats - A microapplication study
Circ. Res. 31, 240 - 247 (1972)

170. Kuschinsky, W., Wahl, M., Neiss, A.
Evidence for cholinergic dilatatory receptors in pial arteries of cats
Pflüg. Arch. 347, 199 - 208 (1974)

171. Lang, W. J., Pearson, L.
Studies on the pressor responses produced by bradykinin and kallidin
Brit. J. Pharmacol. 32, 330 - 338 (1968)

172. Larsen, G. L., Henson, P. M.
Mediators of inflammation
Ann. Rev. Immunol. 1, 335 - 359 (1983)

173. Lazarus, L. H., Perrin, M. H., Brown, M. R.
Mast cell binding of neurotensin:
I. Iodination of neurotensin and characterization of the interaction of
neurotensin with mast cell receptor sites
J. Biol. Chem. 252, 7174 - 7179 (1977)
174. Lazarus, L. H., Perrin, M. H., Brown, M. R., Rivier, J. E.
Mast cell binding of neurotensin:
II. Molecular conformation of neurotensin involved in the stereospecific
binding to mast cell receptor sites
J. Biol. Chem. 252, 7180 - 7183 (1977)
175. Le Roith, D., Shiloach, J., Roth, J.
Is there an earlier phylogenetic precursor that is common to both the
nervous and endocrine systems?
Peptides 3, 211 - 215 (1982)
176. Leander, S., Ekman, R., Uddman, R., Sundler, F., Hakanson, R.
Neuronal cholecystokinin, gastrin-releasing peptide, neurotensin, and
 β -endorphin in the intestine of the guinea pig
distribution and possible motor functions
Cell Tissue Res. 235, 521 - 531 (1984)
177. Lecomte, J., Troquet, J., Cession-Fossion, A.
Sur la nature de l'hypertension artérielle provoquée par la bradykinine et
la kallidine
Arch. Int. Pharmacodyn. Thé. 147, 518 - 524 (1964)
178. Lembeck, F., Fischer, G.
Gekreuzte Tachyphylaxie von Peptiden
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 258, 452 - 456 (1967)
179. Lewis, G. P.
Pharmacological actions of bradykinin and its role in physiological and
pathological reactions
Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 236 - 249 (1963)

180. Maier-Hauff, K., Baethmann, A. J., Lange, M., Schürer, L., Unterberg, A.
The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema
Part 2: studies on kinin formation in focal and perifocal brain tissue
J. Neurosurg. 61, 97 - 106 (1984)
181. Marceau, F., Lussier, A., Regoli, D., Giroud, J. P.
Pharmacology of kinins: their relevance to tissue injury and inflammation
Gen. Pharmacol. 142, 209 - 229 (1983)
182. Martins, A. R., Caldo, H., Coelho, H. L. L., Moreira, A. C.,
Antunes-Rodrigues, J., Greene, L. J., Camargo, A. C. M.
Screening for rabbit brain neuropeptide-metabolizing peptidases.
Inhibition of endopeptidase B by bradykinin potentiating peptide 9a
(SQ 20881)
J. Neurochem. 34, 100 - 107 (1980)
183. Mastrangelo, D., Mathison, R.
Everted portal vein: a sensitive model for studies of vasoactive compounds
J. Cardiovasc. Pharmacol. 5, 98 - 101 (1983)
184. Mathison, R.
Actions of neurotransmitters and peptides on longitudinal and circular muscle
of the rat portal vein
J. Pharm. Pharmacol. 35, 34 - 37 (1983)
185. McCaa, R. E.
Studies in vivo with angiotensin I converting enzyme (kininase II)
inhibitors
Fed. Proc. 38, 2783 - 2787 (1979)
186. McCulloch, J., Kelly, P. A. T.
Effects of cholecystokinin octapeptide on pial arteriolar
diameter
J. Cereb. Blood Flow Metab. 4, 625 - 628 (1984)

187. McDermott, J. R., Smith, A. I., Dodd, P. R., Hardy, J. A., Edwardson, J. A.
Mechanism of degradation of LH-RH and neurotensin by synaptosomal
peptidases
Peptides 4, 25 - 30 (1983)
188. Mense, S.
Sensitization of group IV muscle receptors to bradykinin by 5-hydroxy-
tryptamine and prostaglandin E₂
Brain Res. 225, 95 - 105 (1981)
189. Michelson, M. J., Shelkownikov, S. A.
Isotonic and isometric responses of different tonic muscles to agonists
and antagonists
Brit. J. Pharmacol. 56, 457 - 467 (1976)
190. Miller, R. J., Kachur, J. F., Field, M., Rivier, J.
Neurohumoral control of ileal electrolyte transport
Ann. N.Y. Acad. Sci. 372, 571 - 593 (1981)
191. Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H.
Neuromedin N: a novel neurotensin-like peptide identified in porcine
spinal cord
Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 542 - 549 (1984)
192. Mindroiu, T., Scicli, G., Perini, F., Carretero, O. A., Scicli, A. G.
Identification of a new kinin in human urine
J Biol. Chem. 261, 7407 - 7411 (1986)
193. Monier, S., Kitabgi, P.
Substance P-induced autodesensitization inhibits atropine-resistant,
neurotensin-stimulated contractions in guinea-pig ileum
Europ. J. Pharmacol. 65, 461 - 462 (1980)
194. Monier, S., Kitabgi, P.
Effects of β -endorphin, met-enkephalin and somatostatin on the
neurotensin-induced neurogenic contraction in the guinea-pig ileum
Regul. Peptides 2, 31 - 42 (1981)

195. Novat, H. Z.
The kinin system: its relation to blood coagulation, fibrinolysis and the
formed elements of the blood
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 84, 143 - 202 (1978)
196. Novat, H. Z.
The plasma kallikrein-kinin system and its interrelationship
with other components of blood
in Bradykinin, Kallidin and Kallikrein, E. G. Erdös (ed.), Hdb.
Exp. Pharmacol. XIV Suppl., Springer New York, 1 - 89 (1979)
197. Mueller-Esterl, W., Fritz, H., Machleidt, W., Ritonja, A., Brzin, J.,
Kotnik, M., Turk, V., Kellermann, J., Lottspeich, F.
Human plasma kininogens are identical with α -cysteine proteinase
inhibitors
FEBS Letters 182, 310 - 314 (1985)
198. Munro, A. F.
The effect of adrenaline on the guinea-pig intestine
J. Physiol. (London) 112, 84 - 94 (1951)
199. Nasjletti, A., Malik, K. U.
Relationships between the kallikrein-kinin and prostaglandin systems
Life Sciences 25, 99 - 110 (1979)
200. Nemeroff, C. B., Cain, S. T.
Neurotensin-dopamine interactions in the CNS
Trends in Pharmacol. Sci. 6, 201 - 205 (1985)
201. Ng, K. K. F., Vane, J. R.
Some properties of angiotensin converting enzyme in the lung in vivo
Nature 225, 1142 - 1144 (1970)
202. Niall, H. D.
The evolution of peptide hormones
Ann. Rev. Physiol. 44, 615 - 624 (1982)

203. Oh-Ishi, S., Hayashi, I., Hayashi, M., Yamaki, K., Yamasu, A., Nakano, T.,
Utsunomiya, I., Nagashima, Y.
Evidence for a role of the plasma kallikrein-kinin system in acute
inflammation: reduced exudation during carrageenin- and kaolin-pleuresies in
kininogen-deficient rats
Agents Actions 18, 450 - 454 (1986)
204. Okamoto, H., Greenbaum, L. M.
Isolation and structure of T-kinin
Biochem. Biophys. Res. Commun. 112, 701 - 708 (1985)
205. Oliveira, E. B., Martins, A. R., Camargo, A. C. M.
Isolation of brain endopeptidases: influence of size and sequence of
substrates structurally related to bradykinin
Biochem. 15, 1967 - 1974 (1976)
206. Ondetti, M. A., Cushman, D. W.
Angiotensin-converting enzyme inhibitors: biochemical properties and
biological actions
Critic. Rev. Biochem. 16, 381 - 411 (1984)
207. Ondetti, M. A., Rubin, B., Cushman, D. W.
Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme
Science 196, 441 - 443 (1977)
208. Orlowski, M., Wilk, E., Pearce, S., Wilk, S.
Purification and Properties of a prolyl endopeptidase from rabbit brain
J. Neurochem. 33, 461 - 469 (1979)
209. Paegelow, I., Reissmann S., Arold, H.
Charakterisierung der Bradykininwirkung am glatten Muskel unter besonderer
Berücksichtigung der Latenzzeit
Acta biol. med. german. 34, 451 - 461 (1975)
210. Paegelow, I., Reissmann, S., Arold, H.
Zum Wirkungsmechanismus von Bradykinin an glatten Muskeln
Pharmazie 34, 697 - 713 (1979)

211. Page, E. B.
Ordered hypotheses for multiple treatments: A significance test
for linear ranks
J. Amer. Statist. Assoc. 58, 216 - 230 (1963)
212. Paul, M., Printz, M. P., Harms, E., Unger, T., Lang, R. E., Ganten, O.
Localization of renin (EC 3.4.23) and converting enzyme (EC 3.4.15.1) in
nerve endings of rat brain
Brain Res. 334, 315 - 324 (1985)
213. Pela, I. R., Gardey-Levassort, C., Lechat, P., Rocha e Silva, M.
Brain kinins and fever induced by bacterial pyrogens in rabbits
J. Pharm. Pharmacol. 27, 793 - 794 (1975)
214. Perry, D. C., Sugder, S. T.
Identification of bradykinin in mammalian brain
J. Neurochem. 43, 1072 - 1080 (1984)
215. Pirie, W. R., Hollander, M.
A distribution-free normal scores test for ordered alternatives in the
randomized block design
J. Americ. Statist. Association 67, 855 - 857 (1972)
216. Pisano, J. J.
Kinins in nature
in Bradykinin, kallidin and kallikrein, E. G. Erdös (ed.)
Hdb. Exp. Pharmacol. XXV suppl., Springer, New York, 273 - 286 (1979)
217. Poth, M. M., Heath, R. G., Ward, M.
Angiotensin-converting enzyme in human brain
J. Neurochem. 25, 83 - 85 (1975)
218. Quirion, R.
Interactions between neurotensin and dopamine in the brain: an overview
Peptides 4, 609 - 615 (1983)

219. Quirion, R., Regoli, D., Rioux, F., St-Pierre, S.
The stimulatory effects of neurotensin and related peptides in rat stomach strips and guinea-pig atria
Brit. J. Pharmacol. 68, 83 - 91 (1980)
220. Quirion, R., Rioux, F., Regoli, D., St-Pierre, S.
Selective blockade of neurotensin-induced coronary constriction in perfused rat hearts by a neurotensin analogue
Europ. J. Pharmacol. 61, 309 - 312 (1980)
221. Quirion, R., Rioux, F., Regoli, D., St-Pierre, S.
Compound 48/80 inhibits neurotensin-induced hypotension in rats
Life Sci. 27, 1889 - 1895 (1980)
222. Ragnarsson, U., Syvänen, A. C., Hanberg, U.
Potentiation of bradykinin with synthetic peptides on guinea-pig ileum
Int. J. Peptide Protein Res. 18, 61 - 68 (1981)
223. Rang, H. P.
Stimulant actions of volatile anaesthetics on smooth muscle
Brit. J. Pharmacol. 22, 356 - 365 (1964)
224. Redman, L. W., Regoli, D., Tustanoff, E. R.
Immunological and biological activities of fragments and analogs of bradykinins
Can. J. Biochem. 57, 529 - 539 (1979)
225. Regoli, D.
Peptide antagonists
Trends in Pharm. Sci. 6, 481 - 484 (1985)
226. Regoli, D.
Neurohumoral regulation of precapillary vessels: the kallikrein-kinin system
J. Cardiovasc. Pharmacol. 6, S401 - S412 (1984)

227. Regoli, D., Barabe, J.
Pharmacology of bradykinin and related kinins
Pharmacol. Rev. 32, 1 - 46 (1980)
228. Regoli, D., Barabe, J., Park, W. K.
Receptors for bradykinin in rabbit aorta
Can. J. Physiol. Pharmacol. 55, 855 - 867 (1977)
229. Regoli, D., Drapeau, G., Rovero, P., Dion, S., Rhaleb, N.-E., Barabe, J.,
D'Orleans-Juste, P., Ward, P.
Conversion of kinins and their antagonists into B_1 receptor activators
and blockers in isolated vessels
Europ. J. Pharmacol. 127, 219 - 224 (1986)
230. Regoli, D., Vane, J. R.
A sensitive method for the assay of angiotensin
Brit. J. Pharmacol. 23, 351 - 359 (1964)
231. Reinecke, M.
Neurotensin - Immunohistochemical localization in central and peripheral
nervous system and in endocrine cells and its functional role as
neurotransmitter and endocrine hormone
Prog. Histochem. Cytochem. 16, 1 - 175 (1985)
232. Reinecke, M., Forssmann, W. G., Thiekötter, G., Triepel, J.
Localization of neurotensin immunoreactivity in the spinal cord and
peripheral nervous system of guinea pig
Neurosci. Lett. 37, 37 - 42 (1983)
233. Reinecke, M., Weihe, E., Carraway, R. E., Leeman, S. E., Forssmann, W. G.
Localization of neurotensin immunoreactive nerve fibers in the guinea pig
heart: evidence derived by immunohistochemistry, radioimmunoassay and
chromatography
Neuroscience 7, 1785 - 1795 (1982)

234. Rioux, F., Quirion, R., Leblanc, M.A., Regoli, D., St-Pierre, S.
Possible interactions between neurotensin and prostaglandins in the isolated rat portal vein
Life Sci. 27, 259-267 (1980)
235. Rioux, F., Kerouac, R., St-Pierre, S.
Release of mast cell mediators, vasoconstriction and edema in the isolated, perfused head of the rat following intracarotid infusion of neurotensin
Neuropeptides 6, 1 - 12 (1985)
236. Rioux, F., Kerouac, R., St-Pierre, S.
Further studies on the mechanism of the cardiovascular effect of neurotensin in the rat
Neuropeptides 2, 307 - 317 (1982)
237. Rioux, F., Quirion, R., Regoli, D., Leblanc, M. A., St-Pierre, S.
Pharmacological characterization of neurotensin receptors in the rat isolated portal vein using analogues and fragments of neurotensin
Europ. J. Pharmacol. 66, 273 - 279, 1980
238. Roberts, M. L.
A comparison of the actions of acetylcholine and bradykinin on the guinea pig ileum
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 314, 267-270 (1980)
239. Robinson, B. F.
Differences in blood vessels between species: relation to differences in blood vessels of varying type within the same species
Gen. Pharmacol. 14, 43 - 46 (1983)
240. Rocha e Silva, M.
Method of assay of bradykinin upon the guinea pig gut
Acta physiol. lat.-americana 2, 238 - 250 (1952)

241. Rocha e Silva, M., Beraldo, W. T., Rosenfeld, G.
Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin
Am. J. Physiol. 156, 261 - 273 (1949)
242. Rokaew, A.
Studies on neurotensin as a hormone
Acta Physiol. Scand. S501, 1 - 62 (1982)
243. Roney, G., Lazdonski, M.
The coexistence in rat muscle cells of two distinct classes of Ca^{2+} -dependent K^{+} -channels with different pharmacological properties and different physiological functions
Bioch. Biophys. Res. Commun. 118, 669 - 674 (1984)
244. Roth, J., Le Roith, D., Collier, E. S., Weaver, N. R., Watkinson, A., Cleland, C. F., Glick, S. M.
Evolutionary origins of neuropeptides, hormones, and receptors: possible applications to immunology
J. Immunol. 135, 816s - 819s (1985)
245. Roze, C.
Neurohumoral control of gastrointestinal motility
Reprod. Nutr. Develop. 20, 1125 - 1141 (1980)
246. Rubin, B., Laffan, R. J., Kotler, D. G., O'Keefe, E. H., DeMaio, D. A., Goldberg, M. E.
SQ 14,225 (D-3-mercapto-2-methylpropanoyl-L-proline), a novel orally active inhibitor of angiotensin I-converting enzyme
J. Pharmacol. Exp. Ther. 204, 271 - 280 (1978)
247. Rubin, B., O'Keefe, E. H., Kotler, D. G., DeMaio, D. A., Cushman, D. W.
Use of excised guinea-pig ileum as a predictive test for inhibitors in vivo of angiotensin-converting enzyme
Fed. Proc. 34, 770 (1975)

248. Rupnow, J. H., Taylor, W. T., Dixon, J. E.
Purification and Characterization of a thyrotropin-releasing hormone
deamidase from rat brain
Biochem. 18, 1206 - 1212 (1979)
249. Sachs, L.
Angewandte Statistik
Springer Berlin, 5. Auflage (1978)
250. Sadoul, J.-L., Kitabgi, P., Rostene, W., Javoy-Agid, F., Agid, Y.,
Vincent, J.-P.
Characterization and visualization of neurotensin binding to receptor
sites in human brain
Biochem. Biophys. Res. Comm. 120, 206 - 213 (1984)
251. Sakai, Y., Daniel, E. E., Jury, J., Fox, J. E. T.
Neurotensin inhibition of canine intestinal motility in vivo via alpha-
adrenoceptors
Can. J. Physiol. Pharmacol. 62, 403 - 411 (1984)
252. Schachter, M.
Kallikreins (Kininogenases) - a group of serine proteases with
bioregulatory actions
Pharmacol. Rev. 31, 1 - 17 (1980)
253. Scheffé, H.
A method of judging all contrasts in the analysis of variance
Biometrika 40, 87 - 104 (1953)
254. Schultzberg, M., Hökfelt, T., Nilsson, G., Terenius, L., Rehfeld, J. F.,
Brown, M., Elde, R., Goldstein, M., Said, S.
Distribution of peptide and catecholamine-containing neurons in the gastro-
intestinal tract of rat and guinea pig: immunohistochemical studies with
antisera to substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalins,
somatostatin, gastrin/cholecystokinin, neurotensin and dopamine β -hydroxylase
Neuroscience 5, 689 - 744 (1980)

255. Schuster, V. L.
Mechanism of bradykinin, ADH, and cAMP interaction in rabbit cortical
collecting duct
Am. J. Physiol. 249, F645 - F653 (1985)
256. Schwarz, H.
Die mechanische Spontanaktivität der isolierten Vena portae des
Meerschweinchens: Effekte von Inkubationsbedingungen und einigen mit den
Calciumionen interferierenden Pharmaka
Inaugural-Dissertation München 1982
257. Scicli, A. G., Forbes, G., Nolly, H., Dujovny, M., Carretero, O. A.
Kallikrein-kinins in the central nervous system
Clin. Exper. Theory and Practice A6, 1731 - 1738 (1984)
258. Segawa, T., Hosokawa, M., Kitagawa, K., Yajima, H.
Contractile activity of synthetic neurotensin and related polypeptides on
guinea-pig ileum
J. Pharm. Pharmacol. 29, 57 - 58 (1977)
259. Shaw, C., Thim, L., Conlon, J. M.
(Ser⁷)neurotensin: isolation from guinea pig intestine
FEBS Letters 202, 187 - 192 (1986)
260. Shikimi, T., Kema, R., Natsumoto, M., Yamahata, Y., Miyata, S.
Studies on kinin-like substances in brain
Biochem. Pharmacol. 22, 567 - 573 (1973)
261. Shimuta, S. I., Sabia, E. B., Paiva, A. C. M., Paiva, T. B.
Effect of stretching on the sensitivity of the guinea-pig ileum to
bradykinin and on its modification by bradykinin potentiating peptides
Europ. J. Pharmacol. 70, 551 - 558, 1981
262. Skidgel, R. A., Engelbrecht, S., Johnson, A. R., Erdös, E. G.
Hydrolysis of substance P and neurotensin by converting enzyme and
neutral endopeptidase
Peptides 5, 769 - 776 (1984)

263. St.-Pierre, S. A., Kerouac, R., Quirion, R., Jolicoeur, F. B., Rioux, F.
Neurotensin
Peptide and Protein Rev. 2, 83 - 171 (1984)
264. Stewart, J. M.
Chemistry and biologic activity of peptides related to bradykinin
in Bradykinin, kallidin and kallikrein, E. G. Erdös (ed.),
Hdb. Exp. Pharmacol. XXV suppl., Springer, New York, 227 - 272 (1979)
265. Stürmer, E., Berde, B.
A pharmacological comparison between synthetic bradykinin and synthetic
kallidin
J. Pharmacol. Exp. Therap. 139, 38 - 41 (1962)
266. Stürmer, E., Berde, B.
A comparative pharmacological study of synthetic eledoisin and synthetic
bradykinin
J. Pharmacol. Exp. Therap. 140, 349 - 355 (1963)
267. Svensjö, E., Arfors, K. E.
Dimensions of postcapillary venules sensitive to bradykinin and histamine-
induced leakage of macromolecules
Upsala J. Med. Sci. 84, 47-60 (1979)
268. Svensjö, E., Arfors, K. E., Raymond, R. M., Grega, G. J.
Morphological and physiological correlation of bradykinin-induced
macromolecular efflux
Amer. J. Physiol. 236, H600 - H606 (1979)
269. Szurszewski, J. H.
Physiology of mammalian prevertebral ganglia
Ann. Rev. Physiol. 43, 53 - 68 (1981)
270. Taylor, W. L., Dixon, J. E.
Catabolism of Neuropeptides by a brain proline endopeptidase
Bioch. Biophys. Res. Commun. 94, 9 - 15, (1980)

271. Teichroew, D.
Tables of expected values of order statistics and products of order statistics for samples of size twenty and less from the normal distribution
Ann. of Mathematical Statistics 27, 410 - 426 (1956)
272. Terragno, N. A., Terragno, A.
Release of vasoactive substances by kinins
in Bradykinin, kallidin and kallikrein, E. G. Erdös (ed.),
Hdb. Exp. Pharmacol. XXV suppl., Springer, New York, 407 - 427 (1979)
273. Theodorsson-Norheim, E.
Evidence that (Glu⁴)-neurotensin is the naturally occurring neurotensin in plasma
Peptides 4, 543 - 547 (1983)
274. Theodorsson-Norheim, E., Rosell, S.
Characterization of human plasma neurotensin-like immunoreactivity after fat ingestion
Regul. Pept. 6, 207 - 218 (1985)
275. Thiele, E. A., Strittmatter, S. M., Snyder, S. H.
Substance K and substance P as possible endogenous substrates of angiotensin converting enzyme in the brain
Biochem. Biophys. Res. Commun. 128, 317 - 324 (1985)
276. Toda, N.
Actions of bradykinin on isolated cerebral and peripheral arteries
Am. J. Physiol. 232, 267 - 274 (1977)
277. Trautschold, I.
Assay methods in the kinin system
in Bradykinin, kallidin and kallikrein, E. G. Erdös (ed.)
Hdb. Exp. Pharmacol. XXV, 52 - 81 (1970)
278. Tyrode, M. V.
The mode of action of some purgative salts
Arch. int. Pharmacodyn. 20, 205 - 223 (1910)

279. Unger, T., Ganten, D., Lang, R. E.
Converting enzyme inhibitors: antihypertensive drugs with unexpected mechanisms
Trends in Pharmacol. Sci. 4, 514 - 519 (1983)
280. Unterberg, A., Baethmann, A. J.
The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema
Part 1: Cerebral exposure to bradykinin and plasma
J. Neurosurg. 61, 87 - 96 (1984)
281. Unterberg, A., Baethmann, A., Geiger, R.
The kallikrein-kinin-system as mediator in cerebral edema
Agents and Actions, suppl. 9, 402 - 407 (1982)
282. Unterberg, A., Baethmann, A., Hack, U
Cerebral blood flow and metabolism during bradykinin exposure
In: M. Baldy-Moulinier, D. H. Ingvar, W. S. Meldrum (Hrsg.),
Cerebral blood flow, metabolism and epilepsy, John Libbey Eurotext,
London Paris 1983, S. 174 -179
283. Unterberg, A., Dautermann, C., Baethmann, A., Müller-Esterl, W.
The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema
J. Neurosurg. 64, 268 - 276 (1986)
284. Unterberg, A., Hack, U., Baethmann, A.
Blood flow, metabolism, and function of the brain during cerebral
administration of bradykinin
In: H. Dietz, M. Brock, M. Klinger (Hrsg.), Adv. Neurosurg. 13, Springer,
326 - 329 (1985)
285. Unterberg, A., Wahl, M., Baethmann, A.
Effects of bradykinin on cerebrovascular permeability and resistance
J. Cereb. Blood Flow Metabol. 3, suppl. 1, 234 - 235 (1983)
286. Unterberg, A., Wahl, M., Baethmann, A.
Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels in vivo
J. Cereb. Blood Flow Metabol. 4, 574 - 585 (1984)

287. Vandongen, R., Tunney, A., Barden, A., Mahoney, D.
Potentiation of bradykinin by captopril during suppression of prostacyclin synthesis
Hypertension 4, 642 - 645 (1982)
288. Vanhoutte, P. M., Rimele, T. J.
Role of the endothelium in the control of vascular smooth muscle function
J. Physiol. Paris 78, 681 - 686 (1982 - 1983)
289. Vavrek, R. J., Stewart, J. M.
Competitive antagonists of bradykinin
Peptides 6, 161 - 164 (1985)
290. Verrecchia, C., Hamel, E., Edvinsson, L., Mackenzie, E. T., Seylaz, J.
Role of the endothelium in the pial artery responses to several vasoactive peptides
Acta Physiol. Scand. 127, Suppl. 552, 33 - 36 (1986)
291. Wagner, F., Wahl, M.
The effect of neurotensin on vascular and intestinal smooth muscle
Pflüg. Arch. 402, R17 (1984)
292. Wagner, F., Wahl, M.
Effects of neurotensin in feline pial arteries, guinea pig ileum and portal vein of rat and guinea pig
Arch. int. Pharmac. Therap. 282, 240 - 251 (1986)
293. Wahl, M.
A review of neurotransmitters and hormones implicated in mediating cerebral vasospasm
in *Cerebral Vascular Spasm*, D. Voth, P. Glees (eds.), de Gruyter, New York 223 - 230 (1985)
294. Wahl, M.
Effects of enkephaline, morphine and naloxone on feline pial arteries
J. Cereb. Blood Flow Metab. 5, 451 - 457 (1985)

295. Wahl, M., Kuschinsky, W.

The dilatatory action of adenosine on pial arteries of cats and its inhibition by theophylline

Pflüg. Arch. 362, 55 - 59 (1976)

296. Wahl, M., Kuschinsky, W.

The dilating effect of histamine on pial arteries of cats and its mediation by H_2 -receptors

Circ. Res. 44, 161 - 165 (1979)

297. Wahl, M., Kuschinsky, W.

Unimportance of perivascular H^+ and K^+ activities for the adjustment of pial arterial diameter during changes of arterial blood pressure in cats

Pflügers Arch. 382, 203 - 208 (1979)

298. Wahl, M., Kuschinsky, W., Bosse, O., Olesen, J., Lassen, N. A.,

Ingvar, D. H., Michaelis, J., Thürau, K.

Effect of l-Norepinephrine on the diameter of pial arterioles and arteries in the cat

Circ. Res. 31, 248 - 256 (1972)

299. Wahl, M., Kuschinsky, W., Bosse, O., Thürau, K.

Dependency of pial arterial and arteriolar diameter on perivascular osmolarity in the cat

Circ. Res. 32, 162 - 169 (1973)

300. Wahl, M., Unterberg, A., Whalley, E. T., Baethmann, A., Young, A. R.,

Edvinsson, L., Wagner, F. F. W.

Cerebrovascular effects of bradykinin

in: Neural regulation of brain circulation,

Öman, C., Hardebo, J. E. (ed.), Elsevier New York, S. 419 - 430, 1986

301. Wahl, M., Young, A. R., Edvinsson, L., Wagner, F.

Effects of bradykinin on pial arteries and arterioles in vitro and in situ

J. Cereb. Blood Flow Metab. 3, 231 - 237 (1983)

302. Wahl, M., Young, A. R., Edvinsson, L., Wagner, F.
Effects of kininase II inhibitors on the vasomotor response to bradykinin
of feline intracranial and extracranial arteries in vitro and in situ
J. Cereb. Blood Flow Metab. 3, 339 - 345 (1983)
303. Walascek, E. J.
The effect of bradykinin and kallidin on smooth muscle
in Bradykinin, kallidin and kallikrein, E. G. Erdös (ed.),
Hdb. Exp. Pharmacol. XXV, 421 - 429 (1970)
304. Walascek, E. J., Dyer, D. C.
Polypeptide receptor mechanisms: influence of pH
in Hypotensive Peptides, E. G. Erdös, N. Back, F. Sicuteri,
A. F. Wilde (eds.), Springer Berlin Heidelberg New York 329 - 340 (1966)
305. Walascek, E. J., Dyer, D. C., Gascon, A. L.
Polypeptide receptor mechanisms
Fed. Proc. 27, 67 - 69 (1968)
306. Walascek, E. J., Huggins, C. G., Smith, C. M.
Drugs that modify actions of pharmacologically active polypeptides
Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 281 - 283 (1963)
307. Walker, R., Wilson, K. A.
Prostaglandins and the response of rat isolated ileum and duodenum to bradykinin
Brit. J. Pharmacol. 66, 447P (1979)
308. Walker, R., Wilson, K. A.
Prostaglandins and the contractile action of bradykinin on the longitudinal muscle of rat isolated ileum
Brit. J. Pharmacol. 67, 527-533 (1979)
309. Walter, R., Simmons, W. H., Yoshimoto, T.
Proline specific endo- and exopeptidases
Molecular Cellular Biochem. 30, 111 - 127 (1980)

310. Ward, P. E., Margolius, H. S.
Renal and urinary kallikreins
in Bradykinin, Kallidin and Kallikrein, E. G. Erdös (ed.), Hdb.
Exp. Pharmacol. XXV Suppl., Springer New York, 525 - 548 (1979)
311. Webster, M. E., Gilmore, J. P.
The estimation of the kallidins in blood and urine
Biochem. Pharmacol. 14, 1161 - 1163 (1965)
312. Wei, E. P., Kontos, H. A., Said, S. I.
Mechanism of action of vasoactive intestinal polypeptide on cerebral
arterioles
Am. J. Physiol. 239, H765 - H768 (1980)
313. Weinberg, J., Diniz, C. R., Mares-Guia, M.
Influence of sex and sexual hormones in the bradykinin-receptor interaction
in the guinea-pig ileum
Biochem. Pharmacol. 25, 433 - 437 (1976)
314. Werle, E.
Discovery of the most important kallikreins and kallikrein inhibitors
in Bradykinin, kallidin and kallikrein, E. G. Erdös (ed.),
Hdb. Exp. Pharmacol. XXV, 1 - 6 (1970)
315. Werle, E., Götze, W., Keppler, A.
Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine neue
darmkontrahierende Substanz
Biochem. Z. 289, 217 - 233 (1937)
- 315a. Whalley, E. T., Amure, Y. O., Lye, R. H.
Analysis of the mechanism of action of bradykinin on human basilar
artery in vitro
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 335, 433 - 437 (1987)
316. Whalley, E. T., Fritz, H., Geiger, R.
Kinin receptors and angiotensin converting enzyme in rabbits basilar
arteries
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 324, 296 - 301 (1983)

317. Whalley, E. T., Lye, R., Amure, Y. O.
Effect of kinins on human cerebral vessels
Proc. 9th IUPHAR, London, 657 (1984)
318. Whalley, E. T., Wahl, M.
Analysis of bradykinin receptor mediating relaxation of cat cerebral arteries
in vivo and in vitro
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 323, 66 - 71 (1983)
319. Whalley, E. T., Wahl, M.
The effect of kininase II inhibitors on the response of feline cerebral
arteries to bradykinin and angiotensin
Pflüg. Arch. 398, 175 - 177 (1983)
320. Whalley, E. T., Wahl, M., Sampaio, C. A. M.
Angiotensin-converting enzyme, bradykinin, angiotensin, and cerebral vessel
reactivity
Hypertension 5 (suppl. V) V-34 - V-37 (1983)
321. Wiegershausen, B., Stopp, G., Eichstädt, M.
Zum Mechanismus der Bradykininwirkung am Meerschweinchendarm
Acta biol. med. german. 12, 443 - 458 (1964)
322. Wilen, T., Gustavsson, S., Jung, B.
Effects of neurotensin on small bowel propulsion in intact and vagotomized
rats
Regul. Peptides 4, 191 - 201 (1982)
323. Wilk, S., Orlowski, M.
Degradation of bradykinin by isolated neutral endopeptidases of brain and
pituitary
Bioch. Biophys. Res. Commun. 90, 1 - 6, 1979
324. Wilk, S., Pearce, S., Orlowski, M.
Identification and partial purification of a cation-sensitive neutral
endopeptidase from bovine pituitaries
Life Sci. 24, 457 - 464 (1979)

325. Williams, J. I., Katayama, Y., North, A.
The action of neurotensin on single myenteric neurons
Europ. J. Pharmacol. 59, 181 - 186 (1979)
326. Yang, H. Y. T., Neff, N. H.
Differential distribution of angiotensin converting enzyme in the anterior
and posterior lobe of the rat pituitary
J. Neurochem. 21, 1035 - 1036 (1973)
327. Yang, H.-Y. T., Neff, N. H.
Distribution and properties of angiotensin converting enzyme of rat brain
J. Neurochem. 19, 2443 - 2450 (1972)
328. Yau, W. M., Verdun, P. R., Youther, M. L.
Neurotensin: a modulator of enteric cholinergic neurons in the guinea
pig small intestine
Europ. J. Pharmacol. 95, 253 - 258 (1983)
329. Yokosawa, H., Endo, S., Ogura, Y., Ishii, S.-I.
A new feature of angiotensin-converting enzyme in the brain: hydrolysis of
substance P
Biochem. Biophys. Res. Commun. 116, 735 - 742 (1983)
330. Yoshimoto, T., Ogita, K., Walter, R., Koida, M., Tsuru, D.
Post-proline cleaving enzyme
synthesis of a new fluorogenic substrate and distribution of the
endopeptidase in rat tissues and body fluids of man
Bioch. Biophys. Acta 569, 184 - 192 (1979)
331. Yoshimoto, T., Orlowski, R. C., Walter, R.
Postproline cleaving enzyme: identification as serine protease using
active site specific inhibitors
Bioch. Biophys. Acta 569, 184 - 192 (1979)
332. Yoshinaga, K., Abe, K., Miwa, I., Aida, M., Maebashi, M., Wada, Y.
Assay of urinary kinin
Tohoku J. exp. Med. 81, 246 - 253 (1963)

333. Young, A. R., Edvinsson, L., Wagner, F., Wahl, M.

Bradykinin and Kininase II Inhibitors: an in vitro and in situ investigation
J. Cereb. Blood Flow Metab. 3, Suppl. 1, S212 - S213 (1983)

334. Zetler, G.

Antagonism of the gut-contracting effects of bombesin and neurotensin by
opioid peptides, morphine, atropine or tetrodotoxin
Pharmacology, 21, 348 - 354 (1980)

Die vorliegenden Untersuchungen wurden am Physiologischen Institut in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Michael Wahl durchgeführt und durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Klaus Thureau danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und das Interesse, das er der Durchführung und der Zusammenstellung der Untersuchungen widmete.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Wahl. Von ihm stammt nicht nur die Anregung zu dieser Arbeit, sondern er stand mir auch bei allen theoretischen und praktischen Problemen zur Seite. Die Versuche an den Piaarterien der Katze wurden in Zusammenarbeit mit ihm durchgeführt.

Ferner danke ich Frau Marjana Knonsalla, Frau Eva Dolischan und Frau Maria Köber für die gewährte technische Hilfe und Herrn Dr. Dr. Lothar Schilling für die theoretischen Anregungen.

Herrn Dr. Paul Wagner und Frau Gilda Wagner danke ich für die geduldige Unterstützung beim Erstellen des Manuskripts.

Lebenslauf

Am 24. September 1960 wurde ich als Sohn des Physikers Dr. Paul Wagner und seiner Ehefrau Gilda Wagner, geb. Schröder, in München geboren.

Nach vierjähriger Volksschulzeit in München besuchte ich das Klenzegymnasium in München, an dem ich 1978 die Abiturprüfung bestand.

Im Wintersemester 1978/79 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Dort legte ich im Oktober 1984 die Ärztliche Prüfung ab und erhielt die Approbation.

1985 war ich an der Medizinischen Poliklinik der Universität München beschäftigt, seit Februar 1986 arbeite ich in der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik rechts der Isar der Technischen Universität München.

Die Experimente, die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegen, wurden in den Jahren 1980 bis 1984 durchgeführt.

